

**UNIVERSITÉ MONTPELLIER II
SCIENCES ET TECHNIQUES DU LANGUEDOC**

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ MONTPELLIER II

Discipline : Sciences des Aliments

Option : Microbiologie Alimentaire

Formation Doctorale : Sciences des Aliments

Ecole Doctorale : Sciences des Procédés Biologiques et Industriels

Présentée et soutenue publiquement

Par

David K. AKAKI

Le 20 octobre 2006

Titre :

**Bouillies infantiles à base de mil fermenté à Ouagadougou : Vers une
analyse des risques microbiologiques dans les micro-entreprises
traditionnelles de production**

JURY

Professeur **Joseph-Pierre GUIRAUD**
Docteur **Jean-Pierre GUYOT**
Docteur **Gérard LOISEAU**
Docteur **Brigitte CARPENTIER**
Docteur **Isabelle CHEVALLIER**

Université Montpellier II
IRD Montpellier
ENSIA-SIARC Montpellier
AFSSA Maisons-Alfort
ENITA Clermont-Ferrand

Président
Directeur de thèse
Co-Directeur
Rapporteur
Rapporteur

Remerciements

Que toutes les personnes physiques ou morales qui ont contribuées au bon déroulement et à la réalisation de cette thèse trouvent ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

En effet, financé pour la grande part par la communauté européenne à travers le projet Inco-dev "Cerefer", ce travail a été réalisé au sein des laboratoires de l'UR 106 de l'IRD (Montpellier et Ouagadougou) et de l'UR Qualité des aliments tropicaux du CIRAD (Montpellier) mais aussi grâce à l'école doctorale Sciences et Procédés Biologiques et Industriels de l'UMII pour mon inscription en thèse. Je voudrais remercier toutes ces institutions à travers leurs différents responsables, le Dr Francis DELPEUCH (UR 106), le Dr Max REYNES (UR Qualité des aliments tropicaux) et le Prof. Jean-Marie NAVARRO (école doctorale).

A vous Dr Jean-Pierre Guyot, Directeur du projet Cerefer, tout simplement merci. Des fois, les mots ne suffisent pas pour exprimer tout le bien qu'on ressent. Vous resterez à mes yeux une personne entière et pleine de talents aussi bien dans la recherche que dans les relations humaines. Durant toute la durée des travaux, vous n'avez cessé de me guider et de me donner les armes me permettant de progresser dans ce monde de la recherche. Je suis conscient que votre rôle de Directeur de thèse n'a pas toujours été facile à cause de vos différentes charges mais vous avez su m'accorder l'importance et la priorité nécessaires pour que le "bébé" naisse dans les temps.

Dr Gérard LOISEAU, le grand GG comme ont coutume de dire vos collègues, c'est une Lapalissade que de dire combien vous maîtrisez le monde de la microbiologie des aliments. J'ai été heureux de travailler à vos côtés. Vos remarques pertinentes n'ont fait qu'améliorer le développement de mes travaux.

Dr Claire MOUQUET & Christèle VERNIERE-ICARD, je tiens particulièrement à vous témoigner toute ma reconnaissance pour l'aide logistique inestimable

aussi bien à Ouagadougou qu'à Montpellier pour les enquêtes de terrain, la réalisation des essais et des conférences sans oublier la participation à mon comité de thèse.

Aux membres du jury, sans qui ce travail ne pourra être reconnu comme apte à porter le titre de « Thèse de Doctorat » je vous dis d'avance merci car je suis persuadé que vos différentes remarques et suggestions ne feront qu'apporter des améliorations. Je voudrais commencer par vous mesdames : Dr Brigitte CARPENTIER & Isabelle CHEVALLIER (Rapporteurs). Vous avez la lourde tâche de juger en priorité la valeur scientifique de ce travail que nous avons mené durant ces trois dernières années et de m'autoriser à le soutenir devant tous vos collègues. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance infinie. Professeur Joseph Pierre GUIRAUD (Président) quel honneur que vous présidiez mon jury de thèse, merci infiniment.

Aux agents de l'IRD en général et ceux de l'UR 106 en particuliers (Catherine, Sylvie, Christèle, Isabelle, Christian), j'ose espérer que nous avons entretenu de bonnes relations durant mon séjour. Veuillez accepter toute ma reconnaissance. Une attention toute particulière au Dr Serge TRECHE pour ces conseils avisés.

Il me serait difficile de passer sous silence les personnes qui concourent au bon fonctionnement du programme agro-alimentaire du CIRAD-AMIS. Je voudrais commencer par le Dr Didier MONTET, chef de projets. Votre enthousiasme au travail et votre sens des relations humaines m'ont permis de travailler dans une équipe où il fait bon vivre. Veuillez trouver ici toute ma reconnaissance et ma gratitude.

Marie-Pierre, Jocelyne, Clara, Samira, Isabelle, Marie-Christine, Nadine, Daniel, Pierre j'ai passé de merveilleux moments en votre compagnie. Merci pour tout ce que vous m'avez apporté au cours de ma thèse.

A tous les amis thésards (Ratanaporn, Sandra, Gaukhar, Laurencia, Thavarith, Tahirou, Hassane, Vanhoan, Mourad, Duy, Zelalem, Roger) merci pour les moments que nous avons passés ensemble. A ceux qui ont déjà

soutenu, bonne carrière. A ceux qui vont le faire dans les prochains jours, rassurez-vous, un grand bonheur vous attend.

Christine MORETTI, ton apport à la finalisation de ce rapport est inestimable. Ta disponibilité et ton sens de l'organisation m'ont été d'un grand soutien. Je t'adresse toute ma reconnaissance et plus encore. Hanh HANGOC, ce bref moment passé ensemble m'a été d'une très grande utilité. Merci pour tes conseils et ta disponibilité. Ruben PEREZ, ta sympathie a beaucoup facilité le travail avec toi. Merci et bonne continuation dans le monde de la recherche.

Une mention toute particulière à la direction générale de l'Institut National Polytechnique Félix Houphouët-Boigny de Yamoussoukro (RCI) pour m'avoir autorisé à mener à terme ces travaux de thèse. Au directeur du département Génie Chimique et Agro-alimentaire de l'INP-HB et aux enseignants-chercheurs (Eric, Adima, Koula, Pohé, Ernest, Albert, Assidjo, Soro, Gbongué, Sadat) ainsi qu'à tous mes amis pour m'avoir épaulé durant cette longue marche.

Omettre les chercheurs de l'équipe Agro-alimentaire de l'université de Ouagadougou ainsi que les techniciens serait une grosse erreur de ma part. Aussi, pour m'avoir prêté mains fortes pour les études de terrain, recevez ma reconnaissance infinie.

Samuel AKAKI, Elisabeth AKAKI, Clémentine LAGO-AKAKI merci pour votre confiance sans faille. Constance MAMBO-AKAKI, Laure Emmanuella, Franck Kenneth, vous avez toute ma reconnaissance et mon amour. A vous mes frères et sœurs, je sais que je peux toujours compter sur vous, merci infiniment.

Enfin, je terminerai par toi Félix AKAKI, cher petit-frère, tu n'as pas pu assister à l'accomplissement car tu nous as quittés alors que j'étais dans ma deuxième année de thèse. De là où tu es, je voulais que tu saches combien ton départ prématuré m'a encouragé pour la suite. Je te la dédie personnellement, cette thèse. Tu resteras toujours présent dans mon cœur. Repose en paix.

Liste des figures

N° et titre des figures	Pages
Figure 1 : Schéma de la régulation de l'expression de facteurs de virulence chez <i>Bacillus cereus</i> par quorum-sensing	22
Figure 2 : L'identification des principaux genres entérobactériens.	27
Figure 3 : Aspect des colonies d' <i>Enterobacter sakazakii</i> "AMC8-3" sur milieu désoxycholate lactosé	42
Figure 4a : Aspect des colonies d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 sur milieu ECD MUG	43
Figure 4b : Aspect de colonies d' <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 sur milieu ECD MUG sous UV	43
Figure 5 : Schéma des principales étapes de préparation de bouillies de mil de type <i>ben-saalga</i> et <i>ben-kida</i> à Ouagadougou au Burkina-Faso	60
Figure 6 : Photos de la préparation des bouillies dans différents ateliers traditionnels de Ouagadougou au Burkina-Faso	61
Figure 7 : Carte du Burkina-Faso	63
Figure 8 : Photos illustrant les points de prélèvement lors des étapes de fabrication des bouillies fermentées dans les ateliers de Ouagadougou	64
Figure 9 : Les différentes étapes de la filtration du mil broyé au cours de la préparation des bouillies traditionnelles à Ouagadougou	92
Figure 10 : Les différentes étapes de la cuisson de la pâte de mil fermentée au cours de la préparation des bouillies traditionnelles à Ouagadougou	92
Figure 11 : Produits d'amplification du gène <i>gyrB</i> des espèces de <i>Bacillus</i> : gel à 1% w/w d'agarose (100 volts/ 40 min)	101
Figure 12 : Produits d'amplification de l'ADN ribosomal 16S : gel à 1% w/w agarose (120 volts/ 40 min)	101
Figure 13 : Produits d'amplification du gène de l'hémolysine de <i>B. cereus</i> : gel à 1% w/w agarose (120 volts/ 40 min)	102
Figure 14 : Produits d'amplification du gène codant pour le peptide non-ribosomique impliqué dans la synthèse de la cereulide : gel à 1% w/w agarose (120 volts/ 40 min)	102
Figure 15 : Détection de la toxine diarrhéigène des espèces de <i>Bacillus cereus</i> par agglutination passive reverse de particules de latex (RPLA)	104
Figure 16 : Aspect de souches d' <i>E. coli</i> sur milieu MacConkey Sorbitol 24 heures à 35°C	107

Figure 17 : Dendrogramme établi à partir des caractéristiques phénotypiques (galeries API 50 CHB/E) des souches isolées à Ouagadougou (Burkina-Faso)	115
Figure 18 : Dendrogramme établi à partir des caractéristiques phénotypiques des souches de <i>Bacillus cereus</i> isolées à Ouagadougou (Burkina-Faso)	116
Figure 19 : Dendrogramme issu de l'identification à l'aide des galeries API Staph des souches isolées à Ouagadougou (Burkina-Faso)	117
Figure 20 : Dendrogramme issu de l'identification à l'aide des galeries API 20 E des souches isolées à Ouagadougou (Burkina-Faso)	118
Figure 21 : Dendrogramme issu de l'identification à l'aide des galeries API 20 NE des souches isolées à Ouagadougou (Burkina-Faso)	119
Figure 22 : Dendrogramme issu de l'identification à l'aide des galeries API 20 A des souches isolées à Ouagadougou (Burkina-Faso)	120
Figure 23 : Sources de contamination des aliments lors de la préparation d'aliments dans de petites unités de production	121
Figure 24 : Schéma simplifié des étapes de fabrication et des différents points (encadrés en rouge) d'application de tests de croissance	125
Figure 25 : Évolution de la population de <i>B. cereus</i> dans une pâte non fermentée fabriquée avec du mil pasteurisé.	127
Figure 26 : Évolution de la population de différentes souches <i>B. cereus</i> isolées des ateliers de fabrication dans une pâte lors du processus de décantation	128
Figure 27 : Évolution de la population d' <i>Escherichia coli</i> AMC2-1, d' <i>Enterobacter sakazakii</i> AMC8-3 isolées d'ateliers de fabrication de Ouagadougou dans une pâte à pH 5 (contrôle négatif)	130
Figure 28 : Évolution de la population d' <i>Escherichia coli</i> AMC2-1, ATCC 25922 et d' <i>Enterobacter sakazakii</i> AMC8-3 dans une pâte en cours de fermentation	131
Figure 29 : Évolution de la population d' <i>Escherichia coli</i> AMC2-1, ATCC 25922 et d' <i>Enterobacter sakazakii</i> AMC8-3 dans une pâte additionnée de nisine durant le processus de décantation	134
Figure 30 : Évolution de la population d' <i>Escherichia coli</i> AMC2-1, d' <i>Enterobacter sakazakii</i> AMC8-3 (entérobactéries) et <i>Bacillus cereus</i> BMYP7-3 pendant la fermentation de la pâte de mil (décantation)	136
Figure 31 : Évolution de la population de <i>B. cereus</i> ATCC 9139 et <i>B. cereus</i> BMYP7-3 dans une pâte fermentée de mil à pH 3,95	138
Figure 32 : Cinétique de destruction des spores de <i>B. cereus</i> inoculé dans la pâte fermentée	139
Figure 33 : Évolution de la population de <i>B. cereus</i> ATCC 9139 et <i>B. cereus</i> BMYP7-3 dans une pâte fermentée à pH 4,01 en présence de nisine (0,01mg/ml)	140
Figure34 : Evolution des populations d'entérobactéries (<i>Escherichia coli</i> AMC 2-1, <i>Enterobacter sakazakii</i> AMC 8-3) et de <i>Bacillus cereus</i> BMYP7-3 inoculées simultanément dans une pâte de mil fermentée à pH 4.	141

Figure 35 : Évolution des populations de <i>Bacillus cereus</i> BMYP 7-3 & ATCC 9139 dans une bouillie (pH 3,98) cuite à 95°C/10min puis refroidie	143
Figure 36 : Évolution des populations de <i>Bacillus cereus</i> BMYP 7-3 & ATCC 9139 dans une bouillie (pH 4±0,2) cuite à 95°C/10min puis refroidie avec un ajout de nisine	144
Figure 37 : Évolution des populations d' <i>Escherichia coli</i> (AMC 2-1 & ATCC 25922) et d' <i>Enterobacter sakazakii</i> (AMC 8-3 & CIP 103183 T) dans une bouillie (pH 4,10) cuite à 95°C/10min puis refroidie	146

Liste des tableaux

N° et titre des tableaux	Pages
Tableau 1 : Quelques aliments traditionnels fabriqués à partir de mil chandelle	7
Tableau 2 : Les principales espèces bactériennes responsables d'infections et d'intoxinations d'origine alimentaire	14
Tableau 3 : Quelques caractéristiques des genres représentatifs sélectionnés parmi les <i>Enterobacteriaceae</i>	26
Tableau 4 : Les différents pathovars d' <i>Escherichia coli</i>	32
Tableau 5 : Récapitulatif des caractères dominants de la famille des <i>Streptococcaceae</i>	51
Tableau 6 : Récapitulatif des tests d'orientation réalisés sur les isolats	77
Tableau 7 : Les conditions de PCR pour la DGGE	88
Tableau 8 : Réactifs et concentrations finales dans le mix	88
Tableau 9 : Composition des solutions dénaturantes à 30% et 60% pour la DGGE	89
Tableau 10 : Caractéristiques des échantillons de produits prélevés dans les 10 ateliers à Ouagadougou	93
Tableau 11 : Niveaux totaux des populations d'entérobactéries, de <i>Bacillus</i> , de staphylocoques, de <i>Clostridium</i> dans les échantillons de pâtes de mil fermentées ou non, de granules et de bouillies prélevés chez 10 productrices de bouillies de mil fermentées à ouagadougou	94
Tableau 12 : Nombre d'isolats recoltés au cours des différentes étapes de fabrication des bouillies de mil fermentées : cas des dénombrements sur milieux MacConkey, Mossel, Baird-Parker et TSC	98
Tableau 13 : Identification des isolats de <i>Bacillus</i> prélevés aux différents stades de fabrication des bouillies	99
Tableau 14 : Répartition des souches de <i>Bacillus</i> isolées dans les échantillons prélevés dans les 10 ateliers de fabrication	100
Tableau 15 : Tableau récapitulatif de la caractérisation des isolats de <i>Bacillus cereus</i> par PCR	103
Tableau 16 : Résumé des résultats des tests d'agglutination réalisés sur les souches de <i>B. cereus</i> pour la détection de la présence de la toxine diarrhéigène	104
Tableau 17 : Identification des isolats d'entérobactéries prélevés aux différents stades de fabrication des bouillies	106
Tableau 18 : Répartition des espèces d'entérobactéries isolées aux ateliers de fabrication	107

Tableau 19 : Identification des isolats de Staphylocoques prélevés aux différents stades de fabrication des bouillies	109
Tableau 20 - Répartition des différentes souches de Staphylocoques isolées des ateliers de fabrication	109
Tableau 21 : Récapitulatif des caractères dominants des souches de <i>Staphylococcus</i> sp. sur milieu MEVAG et milieu Columbia au sang de mouton	110
Tableau 22 : Identification des souches de bacilles et coccobacilles non entérobactéries prélevés à différents stades de fabrication des bouillies	111
Tableau 23 : Répartition des différentes espèces de bacilles et coccobacilles non entérobactéries isolées aux ateliers de fabrication	111
Tableau 24 : Identification des souches de bacilles et coccobacilles à Gram positif anaérobies prélevés à différents stades de fabrication des bouillies	112
Tableau 25 : Répartition des différentes souches de bacilles et coccobacilles à Gram positif anaérobies isolées des ateliers de fabrication	113
Tableau 26 : Résumé des dangers identifiés lors des procédés de fabrication	122

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	1
REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	4
I - LES VARIETES DE MIL DANS LE MONDE	4
I.1. - Les mils chandelles.....	4
I.2. - Les mils mineurs	4
I.2.1. - L'éleusine	5
I.2.2. - Le millet des oiseaux.....	5
I.2.3. - Le millet commun	5
I.2.4. - Le petit mil.....	6
I.2.5. - Le moha du Japon	6
I.2.6. - Le millet indigène	6
I.3. - La composition des mils et l'intérêt nutritionnels et technologique	7
I.4. - La transformation	9
I.4.1. - Le maltage	10
I.4.2. - La fermentation lactique.....	10
I.5. - L'utilisation des céréales dans l'alimentation africaine.....	11
II - LES TOXI-INFECTIIONS ALIMENTAIRES CHEZ LES JEUNES ENFANTS	12
II.1. - <i>Bacillus cereus</i>	15
II.1.1. - Conditions de croissance des <i>Bacillus</i>	17
II.1.2. - Le pouvoir pathogène de <i>Bacillus cereus</i>	18
II.1.3. - Les aliments responsables.....	22
II.1.4. - L'isolement et l'identification	23
II.2. - Les entérobactéries.....	24
II.2.1. - Les caractères biochimiques.....	25
II.2.2. - Les caractères antigéniques	28
II.2.3. - <i>Escherichia coli</i>	29
II.2.4. - Les autres entérobactéries.....	34
II.2.5. - L'effet de la température	40
II.2.6. - L'effet du pH.....	40
II.2.7. - Les résistances des entérobactéries à la nisine et aux huiles essentielles.....	41
II.2.8. - La détection et dénombrement des coliformes	41
II.3. - Les coques Gram positif	44
II.3.1. - Le genre <i>Staphylococcus</i>	44
II.3.2. - Les Streptocoques	47

II.4. - Les bactéries anaérobies	53
II.4.1. - La caractérisation et l'identification	53
II.4.2. - Clostridium perfringens	54
III - L'ANALYSE GLOBALE DES FLORES MICROBIENNES A L'AIDE DE METHODES MOLECULAIRES : ..	56
III.1. - La PCR-DGGE.....	56
III.2. - Les autres techniques	57
IV - LES TESTS DE CROISSANCE OU CHALLENGE-TESTS	58
V - L'APPROCHE HACCP (HAZARD ANALYSIS CRITICAL CONTROL POINT)	58
MATERIELS ET METHODES	60
I - LES BOUILLIES FERMENTEES : MODE DE FABRICATION	60
II - LA FABRICATION AU LABORATOIRE DES PATES ET DES BOUILLIES	61
III - LES ORIGINES ET LA NATURE DES ECHANTILLONS DE BOUILLIES COLLECTES A OUAGADOUGOU	62
IV - LES SOUCHES MICROBIENNES	65
V - LES MILIEUX DE CULTURE	66
V.1. - Le bouillon cœur-cerveille	66
V.2. - Le bouillon nutritif.....	66
V.3. - Le bouillon thioglycolate à la résazurine.....	66
V.4. - Le milieu pour Bacillus sp.....	67
V.5. - Le milieu de Baird-Parker (BP).....	67
V.6. - Le milieu gélosé Columbia au sang (GS)	68
V.7. - Le milieu désoxycholate citrate lactose (DCL).....	69
V.8. - Le milieu de Hajna-Kligler (HK)	69
V.9. - Le milieu de Mac Conkey sans cristal violet (MC)	70
V.10. - Le milieu Mannitol Mobilité (MM).....	71
V.11. - Le milieu MEVAG	71
V.12. - Le milieu de Mossel ou Mannitol-egg Yolk-Polymyxin (MYP)	72
V.13. - La gélose nutritive (GN).....	72
V.14. - Le milieu Plate Count Agar (PCA)	73
V.15. - Le milieu Tryptone Sulfite Cyclosérine (TSC).....	73
V.16. - La gélose Viande Foie (VF).....	74
VI - LES DILUANTS.....	74
VI.1. - L'eau peptonée tamponnée	74
VI.2. - L'eau physiologique.....	75

VII - LES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES	75
<i>VII.1 - Les isolements</i>	75
<i>VII.2. - Les dénombrements</i>	75
VIII - L'IDENTIFICATION DES ESPECES BACTERIENNES.....	76
<i>VIII.1. - La coloration de Gram</i>	79
<i>VIII.2. - La recherche de la catalase</i>	79
<i>VIII.3. - Le test oxydase</i>	79
<i>VIII.4. - La recherche de la staphylocoagulase</i>	79
<i>VIII.5. - La recherche de l'entérotoxine de B. cereus (Oxoid)</i>	80
<i>VIII.6. - Les galeries API</i>	81
IX - LES TESTS DE CROISSANCE.....	83
<i>IX.1. - La préparation des inocula</i>	83
<i>IX.2. - Le suivi des populations microbiennes</i>	84
<i>IX.3. - L'utilisation de la nisine</i>	84
X - LES METHODES DE BIOLOGIES MOLECULAIRES	84
<i>X.1. - L'extraction de l'ADN bactérien total d'un échantillon</i>	84
<i>X.2. - L'extraction de l'ADN de bactéries isolées</i>	86
<i>X.3. - La caractérisation des espèces de Bacillus cereus par PCR</i>	86
X.3.1. - L'amplification du gène <i>gyrA-gyrB</i> des souches de <i>Bacillus</i>	86
X.3.2. - L'amplification de l'ADN ribosomal 16S (16S ADNr) des souches de <i>B. cereus</i>	86
X.3.3. - L'amplification du gène de l'hémolysine de <i>B. cereus</i>	87
X.3.4. - L'amplification du gène impliquée dans la synthèse du peptide non-ribosomique impliqué dans la synthèse de la cereulide.....	87
<i>X.4. - La PCR pour la DGGE</i>	87
XI - L'ELECTROPHORESE EN GEL D'ACRYLAMIDE EN GRADIENT DENATURANT (DGGE)	89
<i>XI.1. - La préparation du gel d'acrylamide</i>	89
<i>XI.2. - L'électrophorèse</i>	90
XII - L'ANALYSE STATISTIQUE DES RESULTATS.....	90

RESULTATS ET DISCUSSION.....	91
I - LA NUMERATION, L'ISOLEMENT ET L'IDENTIFICATION DE LA MICROFLORE NON LACTIQUE DES PATES FERMENTEES DE MIL DE LA COMMUNE DE OUAGADOUGOU (BURKINA FASO)	91
<i>I.1. - L'évaluation de la microflore non lactique présente dans les bouillies ben-saalga et ben-kida</i>	<i>91</i>
I.1.1. - Les caractéristiques des ateliers de fabrication et des prélèvements	91
I.1.2 - Les niveaux de contamination en fonction des étapes de fabrication et des sites de production.....	92
<i>I.2. - L'identification des espèces microbiennes isolées.....</i>	<i>98</i>
I.2.1. - Les coques à Gram positif non staphylocoques.....	99
I.2.2. - Les <i>Bacillus</i>	99
I.2.3. - Les entérobactéries.....	105
I.2.4. - Les staphylocoques	108
I.2.5.- Les bacilles et coccobacilles à Gram négatif non entérobactéries.....	110
I.2.6. - Les bacilles et coccobacilles à Gram positif anaérobies.....	112
<i>I.3.- La classification hiérarchisée des souches isolées à l'aide du logiciel Darwin 4.0 ...</i>	<i>114</i>
<i>I.4. - L'application de la méthodologie HACCP aux sites de production</i>	<i>121</i>
<i>I.5.- La conclusion et les perspectives liées à l'appréciation de la qualité des bouillies</i>	<i>122</i>
II - L'ETUDE DE LA CROISSANCE DES ESPECES PATHOGENES SAUVAGES OU DE COLLECTION DANS DES PATES DE MIL FERMENTEES OU NON PAR EN PRESENCE OU EN ABSENCE DE NISINE	124
<i>II.1. - L'effet de la fermentation sur la survie des espèces présentant un danger sanitaire.....</i>	<i>126</i>
II.1.1. - L'étude de la contamination par les espèces de <i>B. cereus</i>	126
II.1.2. - L'étude de la contamination par <i>Enterobacter sakazakii</i> et <i>Escherichia coli</i>	130
II.1.3. - L'effet de la nisine sur <i>Enterobacter sakazakii</i> et d' <i>Escherichia coli</i> inoculés dans la pâte de mil en cours de fermentation.....	132
II.1.4. - Étude de la contamination par un mélange constitué de <i>B. cereus</i> , d' <i>Ent. sakazakii</i> et de <i>E. coli</i>	135
<i>II.2. - L'étude de la contamination de pâtes fermentées en présence ou en absence de nisine</i>	<i>137</i>
II.2.1. - La contamination par <i>B. cereus</i>	137
II.2.2. - L'effet de la nisine sur <i>B. cereus</i> inoculé dans une pâte fermentée.....	140
II.2.3. - Le mélange de population d'entérobactéries (<i>Escherichia coli</i> AMC 2-1, <i>Enterobacter sakazakii</i> AMC 8-3) et de <i>Bacillus cereus</i> (BMYP7-3) dans une pâte de mil fermentée	141

III - L'ETUDE DE LA CONTAMINATION POST-CUISSON DES BOUILLIES FERMENTEES EN PRESENCE OU EN ABSENCE DE NISINE.....	142
<i>III.1. - L'évaluation de la recontamination des bouillies par des souches de B. cereus</i>	142
<i>III.2. - L'évaluation de la recontamination des bouillies par des souches de B. cereus en présence de nisine</i>	143
<i>III.3. - L'évaluation de la récontamination des bouillies par des souches d'Escherichia coli et d'Enterobacter sakazakii</i>	145
<i>III.4. - L'évaluation de la récontamination des bouillies par des souches d'Escherichia coli et d'Enterobacter sakazakii en présence de nisine</i>	147
<i>III.5. - L'étude de la récontamination des bouillies par un mélange d'entérobactéries (Escherichia coli AMC 2-1, Enterobacter sakazakii AMC 8-3) et de Bacillus cereus (BMYP7-3) en présence de nisine</i>	149
IV - LES ESSAIS D'UTILISATION DE LA PCR-DGGE POUR L'APPRECIATION DE LA DIVERSITE MICROBIENNE AU COURS DES TESTS DE CROISSANCE.....	150
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	155
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	160
ANNEXES	177

Introduction

Introduction

Contexte de l'étude

Les aliments fermentés constituent une bonne partie de l'alimentation de nombreuses populations des pays en développement (PED).

La fermentation est une technique de conservation des aliments peu coûteuse, pratique et convenant parfaitement là où d'autres méthodes (mise en conserve, congélation, ...) sont inaccessibles ou inexistantes. Le procédé exige peu d'infrastructures et d'énergie, il est bien intégré dans la vie des villageois dans des zones rurales de nombreux pays en développement (Caplice et Fitzgerald, 1999).

La fermentation renforce la salubrité des aliments en participant à la dégradation de composants toxiques tels que les aflatoxines et les cyanogènes, et en produisant des agents anti-microbiens comme l'acide lactique, les bactériocines (Chi-Zhang *et al.*, 2004; Cleveland *et al.*, 2001), le dioxyde de carbone, l'eau oxygénée et l'éthanol qui facilitent l'inhibition ou l'élimination des agents pathogènes d'origine alimentaire comme les bactéries impliquées dans les toxi-infections alimentaires (TIA) (Caplice et Fitzgerald, 1999). En outre, en produisant des aliments fermentés, on ajoute également de la valeur aux matières premières agricoles, procurant ainsi un revenu et créant des emplois. Dans les PED, et particulièrement en Afrique sub-saharienne, les aliments fermentés sont produits dans de petites unités artisanales ou familiales. Compte tenu des conditions de transformation qui y règnent et selon le type de consommateur, on peut se demander si la fermentation est à elle seule suffisante pour assurer tous les bienfaits que l'on attend en terme de diminution des dangers sanitaires et d'amélioration de la qualité nutritionnelle des aliments.

Fort de tout ce qui précède, le projet européen Inco-Dev « CEREFER », dans le cadre duquel se situe cette thèse, s'est fixé l'objectif à terme d'élaborer des méthodes pour améliorer la qualité de bouillies fermentées à base de céréales, principalement le mil au Burkina-Faso et le maïs au Congo. Il réunit des chercheurs de l'Unité de Recherche 106 de l'IRD (Institut pour la Recherche et le Développement), de l'EPRAN (Équipe Pluridisciplinaire de Recherche en Alimentation et Nutrition) au Congo, de l'Université de Wageningen (Pays-Bas), de l'Université de Jaén (Espagne) et de l'Université de

Ouagadougou (Burkina Faso). Des enquêtes réalisées au cours de ce projet montrent que ces bouillies, élaborées par des petits producteurs locaux et très largement consommées par les jeunes enfants comme aliment de complément à l'allaitement maternel, sont de qualité nutritionnelle inadéquate pour satisfaire leurs besoins en macro- et micronutriments à l'instar de nombreuses bouillies infantiles traditionnelles en Afrique (de Benoist, 1994 ; Delpeuch, 1995 ; Trèche, 1998). Le problème de malnutrition reste posé puisqu'au delà de six mois d'âge des jeunes enfants, le lait maternel apporte à peine 10% des besoins en fer, et 1/3 des besoins en vitamine A et en calcium (FAO/WHO, 1995a; FAO/WHO, 1997 ; Somda, 1994).

Les bouillies fermentées à base de mil à Ouagadougou (Burkina Faso), appelées localement *ben-saalga* et *ben-kida* (*ben-saalga* additionnée de granules au cours de la cuisson), peuvent constituer une source potentielle d'agents pathogènes pouvant affecter la santé des jeunes enfants en raison des pratiques traditionnelles de production de ce type d'aliment (Beattie et Williams, 2002 ; Cleveland *et al.*, 2001 ; Duffy *et al.*, 1999 ; Kunene *et al.*, 1999 ; Motarjemi, 2002 ; Olsvik *et al.*, 1991; Shinagawa, 1990 ; te Giffel *et al.*, 1996). Les aliments destinés aux jeunes enfants ne doivent pas seulement être nutritionnellement adéquats mais aussi sanitaires exempts de germes pathogènes, en particulier de germes responsables de diarrhées infantiles, une des causes majeures de mortalité infantile dans les pays en développement.

Objectifs

L'objectif principal de cette thèse est d'étudier la prévalence de bactéries pathogènes ou indicatrices de contamination fécales et d'apprécier la résilience naturelle ou induite (par l'ajout de composés antimicrobiens) aux contaminations des produits à différentes étapes de transformation.

Dans un premier temps, il a fallu définir notre domaine d'application à travers la reconnaissance du terrain d'étude. Une sélection de dix ateliers traditionnels de production de *ben-saalga* et de *ben-kida* a été faite dans la ville de Ouagadougou sur la base d'enquêtes antérieures. Ces dix ateliers sont répartis dans 7 secteurs sur les 30 que compte la commune de Ouagadougou (Burkina-Faso). Cette sélection intègre différentes variations dans le procédé de fabrication des bouillies (quantité, broyage

humide ou à sec, avec ou sans granules, durée de fermentation, mode de cuisson, etc...). Une première visite nous a permis d'apprécier la qualité microbiologique des échantillons prélevés à différentes étapes de production des bouillies. L'étude de la microflore aux étapes sensibles de la fabrication a été réalisée en utilisant les méthodes de la microbiologie classique. Nous avons procédé à une deuxième visite ne retenant que les sites que nous avons jugés extrêmes (le moins et le plus salubre, pratiques de fabrication différentes) pour une approche HACCP ultérieure.

La deuxième partie de nos travaux a consisté à étudier l'influence des étapes du procédé sur la prévalence des dangers liée à la contamination microbienne en utilisant des souches pathogènes isolées des ateliers et des souches pathogènes de collection pour réaliser des « challenge tests ». Le principe des challenge-tests consiste en l'inoculation artificiellement du produit concerné avec des germes pathogènes à un niveau de contamination choisi et de suivre l'évolution des souches inoculées dans les conditions habituelles de fabrication et d'utilisation de ce produit. Dans le cas des bouillies de mil fermentées, les étapes d'inoculation sont soit, la mouture du mil, soit la décantation de la pâte obtenue après la mouture, soit la bouillie après cuisson. L'efficacité de l'addition d'une bactériocine (nisine) pour consolider la qualité sanitaire des produits a été testée.

La synthèse des résultats obtenus au cours de nos travaux devra permettre de mieux apprécier la qualité hygiénique des bouillies fermentées à base de mil et d'évaluer les dangers dus aux contaminations aux étapes clefs du procédé de transformation, afin de contribuer à une meilleure maîtrise de la qualité sanitaire de ces bouillies.

Revue Bibliographique

Revue bibliographique

I - Les variétés de mil dans le monde

Le nom scientifique du mil est *Pennisetum typhoides* (pour le mil), *Panicum milliaceum* (pour le millet). Il est d'origine asiatique et africaine. Les variétés qui le compose sont essentiellement : le mil chandelle, l'éleusine, le mil commun, le mil à oiseaux, le mil du Japon. Les lieux de culture sont couramment l'Afrique, l'Inde, l'Extrême-Orient, l'ex-URSS (Seetharam *et al.*, 1989).

Le mil supporte la chaleur et la sécheresse. Il croît facilement sur les terrains sablonneux. Il est utilisé pour la fabrication de bouillies, de boissons, des gâteaux, de galettes.

I.1. - Les mils chandelles

Le mil chandelle, *Pennisetum glaucum*, est également connu sous le nom de mil perlé, *bajra* (Inde), mil à épis, séttaire et scirpe (Purseglove, 1972). Ce mil est presque certainement originaire de l'Afrique occidentale tropicale ; on y trouve le plus grand nombre de formes aussi bien sauvages que cultivées. Il y a environ 2 000 ans, cette culture a été transportée en Afrique orientale, centrale, et en Inde où, en raison de son excellente tolérance à la sécheresse, elle s'est établie dans les environnements les plus secs. Le mil chandelle intervient dans différentes confections alimentaires (Tableau 1).

La hauteur de la plante peut varier de 0,5 à 4 m, et le grain peut être presque blanc, jaune pâle, brun, gris, bleu ardoise ou pourpre. Les grains ovoïdes sont longs d'environ 3 à 4 mm, beaucoup plus grands que ceux des autres mils, et le poids pour 1 000 grains varie de 2,5 à 14 g. avec une moyenne de 8 g (Purseglove, 1972). La taille est d'environ le tiers de celle du sorgho. La masse relative du germe par rapport à l'endosperme est plus élevée que dans le sorgho.

I.2. - Les mils mineurs

Les mils mineurs sont communément appelés «petits mils» (Seetharam *et al.*, 1989). Ils comprennent l'éleusine (*Eleusine coracana*), le millet d'Italie ou millet des oiseaux (*Setaria italica*), le millet indigène (*Paspalum scrobiculatum*), le millet commun

(*Panicum miliaceum*), le petit mil (*Panicum sumatrense*) et le moha du Japon (*Echinochloa crusgalli*). Ils ne sont pas importants en termes de production vivrière mondiale, mais sont essentiels en tant que cultures vivrières dans leurs agro-écosystèmes respectifs. Ils sont essentiellement cultivés dans les zones marginales ou dans des conditions d'agriculture où les céréales principales ne donnent pas de rendements viables (Purseglove, 1972 ; Seetharam *et al.*, 1989)

1.2.1. - L'éleusine

C'est une importante denrée de base dans certaines parties de l'Afrique orientale et centrale ainsi qu'en Inde. C'est la principale céréale dans le nord de l'Ouganda et certaines parties de l'ouest de ce pays, ainsi que dans le nord-est de la Zambie. Les grains sont maltés pour la fabrication de bière. L'éleusine peut être stockée plus longtemps sans être attaquée par les insectes (Purseglove, 1972), ce qui en fait une céréale importante en période de famine. La hauteur des cultivars varie de 40 cm à 1 m et la longueur des épis de 3 à 13 cm. La couleur des grains peut aller du blanc jusqu'à une teinte presque noire, en passant par l'orangé-rouge, le brun profond et le pourpre. Le grain est plus petit que celui du mil chandelle, et le poids moyen de 1 000 grains est d'environ 2,6 g.

1.2.2. - Le millet des oiseaux

Il est également connu sous le nom de millet d'Italie, d'Allemagne, de Hongrie, de Sibérie. La principale zone de production est la Chine, mais *S. italica* est la variété de mil la plus importante au Japon et elle est largement cultivée en Inde (Purseglove, 1972). On pense que c'était l'une des cinq plantes sacrées de la Chine ancienne depuis 2 700 ans avant notre ère. La hauteur du plant varie de 1 à 1,5 m, et le grain peut être jaune clair, orangé, rouge, brun ou noir. Le poids pour 1 000 grains est d'environ 2 g.

1.2.3. - Le millet commun

Il est aussi appelé mil, sorgho à balais, mil russe. De culture ancienne, c'est le milium des Romains et le millet connu dans l'histoire. Il a été cultivé par les anciens habitants des cités lacustres en Europe. On pense qu'il a été domestiqué en Asie centrale et orientale et qu'en raison de son aptitude à mûrir rapidement il a souvent été cultivé par les nomades (Purseglove, 1972). Il s'agit d'une plante à racines peu profondes, qui

varie en hauteur de 30 à 100 cm. Le grain contient un pourcentage relativement plus élevé de fibres non digestibles, car il est enfermé dans son enveloppe et difficile à séparer par les processus traditionnels. Le poids pour 1 000 grains est d'environ 5 g (il varie entre 4,7 et 7,2 g). Le millet commun convient particulièrement au climat continental sec et croît dans des climats plus tempérés que les autres mils.

1.2.4. - Le petit mil

Le plant varie en hauteur de 30 à 90 cm, et son panicule oblongue varie en longueur de 14 à 40 cm. Les graines du petit mil sont plus petites que celles du mil commun.

1.2.5. - Le moha du Japon

C'est le mil qui présente la croissance la plus rapide. Il produit une récolte en six semaines (Purseglove, 1972). Il est cultivé comme fourrage aux Etats-Unis et peut produire jusqu'à huit récoltes par an. Cette plante a attiré une certaine attention en tant que fourrage aux États-Unis et au Japon. La hauteur du plant varie de 50 cm à 1 m.

1.2.6. - Le millet indigène

Il est une graminée annuelle en touffe qui atteint 90 cm de haut. Certaines formes étaient un poison pour l'homme et les animaux, probablement à cause d'une infection fongique de la graine (Purseglove, 1972). Celle-ci est enfermée dans un involucre dur, corné, persistant, difficile à retirer. La couleur de la graine peut varier du rouge clair au gris sombre.

Tableau 1 : Quelques aliments traditionnels fabriqués à partir de mil chandelle

Type d'aliment	Noms communs	Pays
Pain non fermenté	<i>Roti, rotii</i>	Inde
Pain fermenté	<i>Kisra, dosa, dosai, galletes, injera</i>	Afrique, Inde
Porridge épais	<i>Ugali, tuwo, saino, dalaki, aceda, atap, bogobe, ting, tutu, kalo, karo, kwon, nshimba, nuchu, tô, tuo, zaafi, asidah, mato, sadza, sangati, kenkey</i>	Afrique, Inde
Porridge fluide	<i>Uji, ambali, edi, eko, kamo, nasha, bwa kal, obushera, bensaalga, benkida</i>	Afrique, Inde
	<i>Ogi, oko, ahamu, kafa, koko, akasa</i>	Nigéria, Ghana
Produits étuvés	<i>Couscous, dogue</i>	Afrique de l'Ouest
Bouillie, aliments type riz	<i>Annam, acha</i>	Afrique, Inde
Snacks		Afrique, Asie
Bières opaques douces/amères	<i>Burukutu, dolo, pito, talla</i>	Afrique de l'Ouest
Bières opaques amères	<i>Marisa, busaa, merissa, urwaga, mwenge, munkoyo, utshwala, utywala, ikigage</i>	Soudan, Afrique australe
Boissons non alcooliques	<i>Mekewu, amaheu, marewa, magou, leting, abrey, huswa</i>	Afrique

(Rooney et McDonough, 1987)

I.3. - La composition des mils et l'intérêt nutritionnels et technologique

Comme les autres céréales, les mils sont essentiellement constitués d'amidon. Le moha du Japon a la plus faible teneur en amidon et la plus faible valeur énergétique.

L'amidon est constitué d'alpha-amylase et d'amylopectine. L'alpha-amylase est formée de longues chaînes non ramifiées où les unités glucose sont réunies par des liaisons α (1→4). L'amylose n'est pas soluble dans l'eau et forme des micelles où la chaîne s'enroule en hélice. L'amylopectine est fortement ramifiée. La chaîne principale comporte des liaisons α (1→4) tandis que les ramifications se fixent par des liaisons α (1→6). La digestibilité de l'amidon dans le tractus digestif, qui dépend de l'hydrolyse par les enzymes salivaires et pancréatiques que sont les α -amylases, détermine la teneur en énergie métabolisable des grains de céréales en libérant un mélange de glucose et de maltose. Ces enzymes hydrolysent les liaisons α (1→4) à n'importe quel point de la chaîne. Une autre enzyme agissant sur l'amylose, la β -amylase, est présente dans le malt et permet de libérer des unités de maltoses.

Lorsqu'on traite les grains par des méthodes telles que la cuisson à la vapeur, la cuisson sous pression, intervient alors le gonflement de l'amidon qui en accroît la digestibilité. Ce phénomène a été attribué au fait que les granules d'amidon sont libérés de la matrice protéique, ce qui les rend plus accessibles aux enzymes. On a constaté que le mil chandelle présente une très forte activité amylasique, environ 10 fois plus que celle du grain de blé (Sheorain et Wagle, 1973), ce qui explique

probablement la faible viscosité des bouillies confectionnées avec la farine obtenue avec ce type de mil. Après le maltage du grain, la viscosité de la pâte est réduite et la quantité en éléments nutritifs, particulièrement l'apport énergétique, renforcée. C'est sur cette base que l'on élabore les aliments de complément à forte valeur énergétique à base de mil malté (Malleshi et Desikachar, 1982 ; Trèche, 1999).

De fortes variations sont constatées dans la composition en minéraux. Elles sont fonction de la composition et la nature du sol. Ce sont ces principaux facteurs environnementaux qui en déterminent la teneur. (Jambunathan et Subramanian, 1988). On y trouve globalement du calcium, du magnésium, du sodium, du fer, du zinc et du potassium. Le maltage multiplie la teneur en fer ionisable du mil et augmente sensiblement la teneur en zinc soluble, attestant de l'amélioration de la disponibilité *in vitro* de ces deux éléments (Sankara Rao et Deosthale, 1983).

Des études *in vitro* ont montré que la disponibilité biologique du fer était médiocre dans les variétés couramment cultivées à grains très pigmentés d'éleusine, en raison de leur teneur en tanin. Les phytates, facteurs antinutritionnels présents dans le mil, représentent une catégorie complexe de composés naturels du phosphore pouvant avoir une influence notable sur les propriétés fonctionnelles et nutritives des aliments. L'acide phytique possède une forte capacité de liaison et peut donc constituer des complexes avec des protéines et des cations multivalents. La réduction du tanin, soit par extraction à l'aide d'un solvant, soit par germination de la graine, renforcerait la teneur en fer ionisable.

Ces études ont également montré que la disponibilité du fer (fer ionisable) était plus élevée dans les variétés d'éleusine à grains blancs et sans tanin (Udayasekhara Rao et Deosthale, 1988).

L'une des caractéristiques de la composition des grains de mil est leur forte teneur en matière sèche. L'éleusine a la plus forte teneur en calcium de toutes les graines alimentaires. Une haute teneur en fibres et une mauvaise digestibilité des éléments nutritifs sont d'autres caractéristiques des grains de mil, qui diminuent fortement leur acceptabilité par le consommateur.

La teneur en protéines est sensiblement identique à celle du maïs et du blé. Le profil d'acides aminés essentiels montre que la lysine, la thréonine, la méthionine, la cystine

et le tryptophane sont présents à des degrés divers dans les grains de mil. Le mil chandelle, le plus riche en protéines, a une teneur en protéines qui se situe généralement entre 6 à 21% (w/w) (Serna-Saldivar *et al*, 1991). L'éleusine est pauvre en protéines. Les protéines du mil commun sont déficientes en lysine ainsi qu'en thréonine et en tryptophane (Chung et Pomeranz, 1985).

Le mil chandelle et le petit mil ont une plus forte teneur en lipides, alors que l'éleusine en contient la quantité la plus faible. Les principaux acides gras sont l'acide linoléique, l'acide oléique et l'acide palmitique. On a constaté de nettes différences de composition en acides gras dans les fractions de lipides neutres, de phospholipides et de glycolipides (Osagie et Kates, 1984). Les lipides améliorent la densité énergétique et interviendraient aussi dans la réduction de la viscosité de la bouillie en induisant une réticulation de l'amylose.

En général, les grains complets sont une source importante de vitamines telles que la thiamine, la riboflavine, la niacine, l'acide pantothénique, l'acide folique, l'acide ascorbique, le rétinol, le tocophérol. La cuisson de la pâte fermentée diminuerait la teneur en thiamine (64%) et en riboflavine (28%) par rapport à la pâte non cuite. Des pertes analogues de vitamines après cuisson de la farine de mil chandelle ont été aussi observées (Dassenko, 1980). La fermentation de la pâte de mil entraîne une augmentation de la thiamine et de la riboflavine. La germination des grains de mil augmenterait la teneur en acide ascorbique (Dassenko, 1980).

I.4. - La transformation

La transformation implique la séparation partielle et/ou la modification des trois fractions de la graine de céréale à savoir le germe, l'endosperme et le péricarpe. Les techniques traditionnelles couramment utilisées comprennent le décorticage (généralement par pilage suivi de vannage et parfois de tamisage), le maltage, la fermentation, le rôtissage, le floconnage et le broyage (Eastman, 1980).

Le premier objectif de la transformation est généralement d'éliminer une partie du son qui constitue les couches extérieures fibreuses des grains. Cela se fait généralement en pilant puis en vannant ou en tamisant. Lorsqu'on pile du grain convenablement préparé, la fraction son contient l'essentiel du péricarpe ainsi qu'une partie du germe et de l'endosperme. Cette fraction est généralement utilisée pour l'alimentation des

... et d'autres fractions, qui contiennent l'essentiel de l'endosperme et une grande partie du germe ainsi qu'une partie du péricarpe, est conservée pour la consommation humaine.

1.4.1. - Le maltage

Le maltage implique de faire germer le grain avec apparition d'une pousse. En général, le grain est trempé pendant 16 à 24 heures, ce qui lui permet d'absorber suffisamment d'humidité pour germer et pour que des pousses apparaissent. Au cours du processus de germination, le grain produit de l'alpha-amylase, une enzyme qui convertit l'amidon insoluble en oses solubles (de Benoist, 1994 ; de Benoist, 1999 ; Trèche, 1998 ; Trèche, 1999). La farine à base de grains maltés est de plus en plus utilisée dans la production d'aliments pour enfants à forte valeur énergétique. Les niveaux d'enzymes amylolytiques et protéolytiques dans le mil malté sont comparables à ceux trouvés dans l'orge maltée. A titre d'exemple, l'ajout de 5% (w/w) seulement d'éleusine maltée réduirait considérablement la viscosité des aliments de complément céréaliers (Moshá et Svanberg, 1983 ; Seenappa, 1988).

1.4.2. - La fermentation lactique

La fermentation lactique est une des plus anciennes techniques de transformation et de conservation des aliments. Elle est réalisée par des bactéries dites lactiques conduisant à la production d'acide lactique suite au catabolisme de molécules simples ou complexes contenus dans les farines de mil. La conséquence immédiate est l'acidification et une diminution du pH. Au cours du processus, il est possible d'observer une disparition de certains facteurs anti-nutritionnels (phytates, oligosaccharides). Elle améliore aussi la digestibilité, l'aspect et rehausse la valeur nutritive et le goût (Coulin *et al.*, 2006 ; Motarjemi, 2002 ; Tetteh *et al.*, 2004) grâce à une meilleure digestibilité des protéines, une disponibilité des sels minéraux ainsi qu'une hausse des teneurs en vitamines.

La fermentation s'accompagne aussi d'une inhibition de la croissance voire d'une disparition des bactéries pathogènes responsables des toxi-infections alimentaire (Motarjemi, 2002 ; Rosslund *et al.*, 2005a ; Rosslund *et al.*, 2005b ; International Food Safety Authorities Network, 2005 ; Tetteh *et al.*, 2004). Ce sont essentiellement la valeur du pH des produits fermentés et les teneurs en acides organiques

(principalement l'acide lactique) qui interfèrent sur la croissance des bactéries entéro pathogènes. Il est important de souligner aussi le rôle joué par les bactériocines et autres molécules produites par les bactéries lactiques. Il est parfaitement établi que la nisine, une bactériocine produite par *Lactococcus lactis*, agit contre les espèces de *Bacillus* entéro pathogènes (Kuwano *et al.*, 2005). La nisine est soluble dans l'acide chlorhydrique et stable jusqu'à 100°C dans les acides dilués. La Dose Journalière Admise est comprise entre 0-0,8 mg/kg (Walser *et al.*, 2001). Le peroxyde d'hydrogène produit par certaines bactéries lactiques est aussi un bon moyen de préservation des aliments quant à prolifération des germes pathogènes tels que *Bacillus* (Rosslund *et al.*, 2005a ; Rosslund *et al.*, 2003 ; Rosslund *et al.*, 2005b ; Valero *et al.*, 2003 ; Cleveland *et al.*, 2001).

I.5. - L'utilisation des céréales dans l'alimentation africaine

Les régions tropicales semi-arides d'Afrique de l'Ouest comprenant la totalité du Sénégal, la Gambie, le Burkina-Faso, le Cap-Vert, d'importantes fractions méridionales de la Mauritanie, du Mali et du Niger, ainsi que les zones nord de la Côte d'Ivoire, du Ghana, du Togo, du Bénin et du Nigéria sont celles où l'on produit le plus de céréales (Matlon, 1990). Ces régions sont de grosses consommatrices d'aliments à base de céréales. Les produits céréaliers fermentés sont employés de longue date dans l'alimentation en Afrique. C'est le cas de l'*ogi* au Nigeria qui est une bouillie acide à base de maïs, de l'*uji* au Kenya fait à base de sorgho, de mil ou de manioc, du *ben-saalga* à base de mil fermenté au Burkina-Faso et du *kenkey* au Ghana. Cette fermentation lactique permet d'obtenir une bouillie à saveur acide bien acceptée par les enfants.

Les aliments pour les nourrissons et les jeunes enfants doivent être faciles à avaler (liquides), faciles à digérer, nourrissants pour un faible volume (haute valeur énergétique) (Trèche, 1998). Les bouillies consommées par les nourrissons et les jeunes enfants peuvent être préparées soit à partir de produits secs, couramment désignés sous le nom de farines infantiles, soit à partir de produits fermentés humides. Bien que ces derniers présentent un certain avantage sanitaire, leur utilisation est limitée par la difficulté de standardiser leur production. Elle reste réservée aux populations ayant l'habitude de consommer des produits fermentés. L'utilisation de farines infantiles est plus répandue (Trèche, 1998).

Les bouillies épaisses que sont *ugali*, *foufou*, *tô*, *asida*, *banku* ou *akple*, *aprapransa*, *akassa* etc... sont autant de noms usuels utilisés dans les zones de production. Ces bouillies épaisses sont préparées à partir de farines pures de sorgho, mil ou maïs, ou à partir d'un mélange de ces farines. La farine est simplement bouillie avec de l'eau jusqu'à obtention de la consistance désirée. Elle est consommée avec des sauces de légumes pouvant contenir de la viande ou du poisson (Rooney et McDonough, 1987).

Les Bouillies claires (*uji*, *nasha*, *medida*, *massa*, *akassa* etc...) quant à elles sont de la farine pure ou de la farine composée, jetées dans de l'eau bouillante et cuites de façon à former une bouillie claire consommée au petit déjeuner. Au Burkina-Faso, le *bensaalga* est une bouillie claire utilisée dans l'alimentation très souvent au petit déjeuner. Elle est confectionnée par cuisson d'une pâte fermentée de mil (Trèche, 1998)

Hormis ces deux grands groupes, d'autres préparations culinaires comme le *kisra*, le *kenkey*, l'*injera*, etc... sont aussi possibles avec les farines d'amidon. Le *kisra* est un aliment de base fait au Soudan à partir de farine de manioc. Il s'agit d'une crêpe mince. La finesse de la farine joue un rôle important sur sa texture. Il est fabriqué en mélangeant du levain, de la farine et de l'eau pour former une pâte qu'on laisse reposer et fermenter toute la nuit. Le *kisra* est servi avec des sauces et des ragoûts (légumes, viande et légumineuses sèches), il est également consommé comme un casse-croûte. Le *kenkey* est le plat principal préparé au Ghana à partir d'une pâte de maïs fermentée. La pâte est divisée en deux parties, dont l'une est cuite et mélangée avec la portion crue. Le mélange est façonné en boulettes qui sont enveloppées dans des feuilles sèches de bananier ou des rafles de maïs, puis bouillies. L'*injera* est une crêpe acide fermentée et levée, aplatie et ronde, qui constitue un pain en éthiopie (Rooney et McDonough, 1987).

II - Les toxi-infections alimentaires chez les jeunes enfants

Une relation synergique existe entre la malnutrition et les infections diarrhéiques alimentaires (Amy *et al.*, 2000). Il est parfaitement établi que les aliments de compléments contaminés sont responsables d'une proportion importante de maladies diarrhéiques chez les nourrissons et le jeune enfant - dont environ 13 millions sont mortelles (Motarjemi *et al.*, 1993) - surtout dans les pays en développement. A l'exclusion de la Chine, on estime à 1,4 milliard le nombre d'épisodes diarrhéiques dont

sont victimes dans le monde les enfants de moins de cinq ans (Amy *et al.*, 2000 ; Motarjemi *et al.*, 1993 ; WHO, 1993). Cette situation est liée à la mauvaise qualité de l'eau, à la faible hygiène du personnel, mais surtout à la production et à la recontamination des aliments (Motarjemi *et al.*, 1993 ; Motarjemi, 2002 ; Tetteh *et al.*, 2004). L'écologie microbienne des aliments en cause dans le cas des infections alimentaires en général, montre une très grande diversité de genres responsables (China *et al.*, 2002 ; Kunene *et al.*, 1999 ; Tetteh *et al.*, 2004) (Tableau 2).

Tableau 2 : Les principales espèces bactériennes responsables d'infections et d'intoxications d'origine alimentaire

<i>Espèce</i>	<i>Pathologie</i>	<i>Fréquence</i>	<i>Danger</i>	<i>Populations limites (log₁₀)</i>
<i>Salmonella choleraesuis</i> subsp <i>choleraesuis</i>	gastro-entérite, diarrhée, crampes abdominales, fièvre, nausées, vomissements, céphalées, septicémie avec envahissement des tissus, (rare), fièvre entérique grave typhoïde (très rare)	+++	++/+++	1 à 7
<i>Clostridium perfringens</i>	Diarrhée, douleurs abdominales, entérite nécrosante (rare)	+++	++	
<i>Staphylococcus aureus</i> (si entérotoxigène)	vomissements et crampes abdominales, diarrhée et céphalée (parfois)	+++	+	>6 (si entérotoxigène)
<i>Bacillus cereus</i>	diarrhée, crampes abdominales (type A), vomissement (type B)	++	+	5 à 9
<i>Campylobacter jejuni</i>	gastro-entérite, diarrhée, douleurs abdominales, fièvre, céphalées, envahissement des tissus, méningites, (rare) syndrome pseudoappendiculaire (rare)	+	++	3
<i>Shigella spp.</i>	shigellose: douleurs abdominales, diarrhée, dysenterie bacillaire: fortes fièvres, vomissements, douleurs abdominales vives, dysenterie.	++	++	1 à 2
<i>Escherichia coli</i>	diarrhées des touristes (ETEC) ; vomissements, crampes abdominales, dysenterie, HUS (EHEC) ; fièvres, vomissements, crampes et diarrhées (EIEC) ; Diarrhée, nausées, vomissements, crampes abdominales, céphalée et fièvre (EPEC)	++	++/+++	6 à 10 3 (EHEC)
<i>Streptococcus spp.</i>	groupe A : maux de gorge, fièvre, rougeurs cutanées, diarrhée, vomissements ; Groupe C : pharyngites ; groupe G: pharyngites	++	+	>8
<i>Vibrio vulnificus</i>	fièvre, baisse de la pression sanguine, problèmes hépatiques.	++	+++	4 à 6
<i>Listeria monocytogenes</i>	fatigue, fièvre modérée ; Individus immunodéprimés ; avortement, méningites, encéphalites.	++	+++	Faible mais variable
<i>Yersinia enterocolitica</i>	fièvre, douleurs abdominales, diarrhée, syndrome pseudo-appendiculaire	++	+	6
<i>Vibrio cholerae</i>	Choléra : diarrhée abondante, crampes abdominales, vomissements, déshydratation.	++	++	6 à 10
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	diarrhées liquides, douleurs abdominales, nausées, vomissements	++	++	5 à 9
<i>Clostridium botulinum</i>	botulisme : trouble de l'accommodation, nausées, douleurs abdominales, constipation, asphyxie, paralysie généralisée.	+	+++	
<i>Aeromonas hydrophyla</i>	diarrhée, dysenterie	+	+	6
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	diarrhée	+	+	6

+ / ++ / +++ / ++++ faible/moyen/fort

(China et al., 2002)

II.1. - *Bacillus cereus*

Les *Bacillus* sont ubiquitaires car leurs spores leur confèrent une grande résistance. Ils sont fréquents dans les sols qui constituent le principal réservoir, dans l'eau de mer, dans l'eau douce, les céréales, les produits laitiers, carnés (Abriouel *et al.*, 2002; Andersson *et al.*, 1995 ; Haque et Russell, 2005 ; Sutra *et al.*, 1998). Ils contaminent aussi les aliments crus, cuits et même pasteurisés en raison de la thermorésistance des spores (Andersson *et al.*, 1995 ; Guiraud, 1998). A titre d'exemple, le temps de réduction décimal à 103°C de *Bacillus subtilis* est de 1,1 mn (Palop *et al.*, 1999). Les spores les plus thermosensibles de *Bacillus cereus* ont un $D_{90^{\circ}\text{C}}$ inférieur à 1 minute et les plus thermorésistantes ont un $D_{130^{\circ}\text{C}}$ de l'ordre de 0,3 minute (la valeur D est le temps de réduction décimale, c'est à dire le temps requis pour réduire de 90% une population de micro-organismes ou de spores dans un échantillon à une température donnée exprimée en °C).

Le genre *Bacillus* est très hétérogène et comprend au moins 36 espèces. Ce sont des bacilles gram +. La classification la plus utilisée se fonde sur la forme de la spore et permet de distinguer 3 groupes : *Bacillus* à spore ovale non déformante, *Bacillus* à spore ovale déformante, *Bacillus* à spore ronde déformante. Ces bacilles cultivent en aérobiose (famille des *Bacillaceae*) sans exigences nutritionnelles particulières. Ils possèdent une catalase. Leur type respiratoire est aérobie stricte ou aéro-anaérobie (Prescott, *et al.*, 1995).

A l'observation microscopique, on voit généralement des bacilles assez gros, parfois aux extrémités carrées. La coloration de Gram de colonies de *Bacillus* montrent des formes Gram + et Gram -, ces dernières étant probablement des colonies vieilles de faible viabilité (Guiraud, 1998). La taxonomie des bacilles est complexe car on regroupe sous cette dénomination un grand nombre de bacilles Gram + très différents comme le montre l'étalement extrême des valeurs du GC % de 32 à 69%.

Bacillus cereus est un éponyme pour le grand groupe de espèces qui inclut habituellement *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. weihenstephanensis*, *B. mycoides* (Borge *et al.*, 2001 ; Manzano *et al.*, 2003a ; Manzano *et al.*, 2003b ; Prescott *et al.*, 1995 ; Prütz *et al.*, 1999 ; Sutra *et al.*, 1998). Le séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S a permis la définition de nouveaux genres aux côtés d'anciens qui

subdivisaient déjà cette famille, avec de nombreux transferts (Heyrman et Swings, 2001) : *Alicyclobacillus* (thermoacidophiles), *Paenibacillus* (incluant d'anciens *Bacillus*, *polymyxa*, *macerans*, *alvei...*), *Brevibacillus* (ex *B. brevis* et *laterosporus*), *Aneurinibacillus*, *Virgibacillus*, *Halobacillus* (ex *Sporosarcina*, coques sporulés), *Amphobacillus*, *Gracilibacillus*, *Geobacillus*, *Marinibacillus*, *Salibacillus*, *Ureibacillus*, *Salibacillus*. La différenciation utilisant les complexes 16S-23S rRNA et *gyrA-gyrB* (codant pour les gènes responsables des résistance aux quinolones) donne des résultats pas toujours aptes à fournir une séparation d'espèces (Shangkuan *et al.*, 2000).

Seules deux espèces ont un pouvoir pathogènes élevé (Cherif *et al.*, 2003) : *Bacillus cereus* responsables d'intoxications alimentaires et *Bacillus anthracis*. On peut aussi citer *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* et *Bacillus sphaericus* qui ont été associés à des intoxications alimentaires dues à des entérotoxines et des toxines émétiques comme pour *Bacillus cereus*.

Bacillus anthracis possède un pouvoir pathogène élevé. Cette espèce est responsable de la maladie du charbon. C'est une zoonose surtout des ruminants qui peut se transmettre à l'homme de plusieurs façons, par les spores (forme de résistance de la bactérie) ou par la viande contaminée. Cette maladie touche aussi certains oiseaux (autruches, canards), des insectes et leurs larves (Cheun *et al.*, 2003). Contrairement aux autres espèces du genre, les espèces virulentes de *Bacillus anthracis*, même à faible concentration, tuent le cobaye ou la souris en 24 à 48 heures. Le bacille anthracique est protéolytique, liquéfie la gélatine mais ne possède pas d'uréase. Il fermente certains oses (glucose, maltose, saccharose) et produit de l'acétyl-méthyl-carbinol (test de Vosges Proskauer positif) qui est un caractère utilisé pour la classification des *Bacillus* (Guiraud, 1998).

Bacillus cereus est responsable d'intoxications alimentaires mais surtout chez les sujets fragiles. *Bacillus cereus* est un fort producteur d'enzymes (Palop *et al.*, 1999 ; Giffel *et al.*, 1996). Il est important de noter que le rôle de ces enzymes dans les maladies provoquées par les aliments n'est pas encore clarifié (Ghelardi *et al.*, 2002 ; Hansen et Hendriksen, 2001).

Bacillus cereus, peut réduire le nitrate en nitrite. Il peut métaboliser l'arabinose et le mannitol. Cependant, la non-fermentation du mannitol est une des caractéristiques utilisée dans la recherche de cette bactérie sur milieu Mannitol-Yolk-Polymyxin (MYP) (Andersson *et al.*, 1995 ; Beattie et Williams, 2002 ; Guiraud, 1998 ; te Giffel *et al.*, 1996).

II.1.1. - Conditions de croissance des Bacillus

II.1.1.1. - La température

Les *Bacillus* sont habituellement divisés en deux grands groupes en se basant sur la température de croissance à savoir les psychrotrophes et les mésophiles. Les psychrotrophes se multiplient entre 5°C – 10°C (avec une préférence pour 10°C) ; la croissance des mésophiles est quasi-nulle en-dessous de 8°C et lente à 10°C (Sutherland *et al.*, 1996). La température optimale de croissance est comprise entre 30 et 37°C (parfois beaucoup plus en ce qui concerne les stearothermophiles), le temps de génération optimale varie de 18 - 27 mn. Il est de 26-31 mn dans du riz bouilli maintenu à 30°C. La germination des spores peut survenir à des températures allant de 5 à 8°C.

La réfrigération ou la cuisson peuvent être utilisées pour stabiliser ou réduire la croissance de *Bacillus* (Ultee et Smid, 2001). Elles agissent sur la croissance des espèces soit en la ralentissant soit en l'inhibant. Une sélection des espèces est de plus possible par la recherche de espèces résistantes à ces conditions de culture extrêmes (Rajkovic *et al.*, 2005).

II.1.1.2. - L'effet du pH

Les acides organiques et minéraux ont des effets différents sur la croissance des *Bacillus* (Leguerinel et Mafart, 2001). L'effet est fonction de la valeur du pKa. A titre d'exemple, les acides les plus actifs sont en ordre décroissant : acide acétique>acide lactique>acide malique>acide tartrique avec des valeurs de pKa respectivement de 4,75, 3,86, 3,40, 3,00. Le fait de faire séjourner des formes végétatives dans un environnement acide modéré (pH 4 - 4,5) améliorerait leurs capacités à se développer en milieu acide (Borge *et al.*, 2001; Collado *et al.*, 2003; Fernandez *et al.*, 2001; Haque et Russell, 2005; Leguerinel et Mafart, 2001; Mundo *et al.*, 2004 ; Nguyen-The *et al.*, 2003).

II.1.1.3. - L'effet des molécules antimicrobiennes

A l'effet du pH, il faut ajouter la résistance aux sels biliaires. Les aliments riches en amidon (comme les céréales) neutralisent l'effet inhibiteur des sels biliaires (Leguerinel et Mafart, 2001). La consommation de bouillies de céréales contaminées par des spores des espèces de *Bacillus* pourrait être source de toxi-infections.

La croissance des espèces de *Bacillus* peut se poursuivre jusqu'à une concentration en chlorure de sodium égale à 7,5% (w/w) ; elle est, en général, inhibée avec l'augmentation de la concentration en NaCl du milieu (Rajkovic *et al.*, 2005 ; Sutherland *et al.*, 1996).

La croissance est inhibée par la nisine (Cleveland *et al.*, 2001) et l'acide sorbique. Il en est de même de certaines huiles essentielles telles que l'alpha terpinéol, le citral, le thymol (Chen *et al.*, 2004 ; Rajkovic *et al.*, 2005 ; Valero et Salmeron, 2003 ; Valero and Francés, 2006) et le carvacrol (Rajkovic *et al.*, 2005 ; Ultee et Smid, 2001 ; Valero et Salmeron, 2003 ; Valero et Francés, 2006). Cette action est plus marquée pour la production des toxines diarrhéiques. Ces molécules agiraient avec certains composés pour modifier la perméabilité de la membrane cytoplasmique aux protons (Ultee et Smid, 2001). La nisine inhibe la sporulation à pH <4 et à une température >20°C par la formation de pores dans la membrane cellulaire (Walser *et al.*, 2001).

II.1.2. - Le pouvoir pathogène de *Bacillus cereus*

Il est classique de distinguer les phospholipases (les phospholipases C, la sphingomyélinase, la phosphatidylinositol phospholipase, la phosphatidylcholine phospholipase), les hémolysines (la céréolysine O ou hémolysine I, la céréotysine AB, l'hémolysine II, la cytotoxine K, l'hémolysine III), les entérotoxines (la toxine HBL, la toxine NHE ou Non-Haemolytic Enterotoxin, la toxine BceT), la toxine responsable du syndrome émétique ou cereulide et les protéases (Ghelardi *et al.*, 2002 ; Hansen et Hendriksen, 2001). On s'attardera sur les deux plus courantes impliquées dans les cas de toxi-infections alimentaires.

En effet, *Bacillus cereus* est la cause de deux types de maladies d'origine alimentaire : une intoxication émétique (vomissements) due à l'ingestion d'une toxine (cereulide) préformée dans les aliments et une infection diarrhéique due à l'ingestion de bactéries ou de spores bactériennes conduisant à la production d'entérotoxines dans l'intestin grêle (Toxines diarrhéigènes) (Agata *et al.*, 2002 ; Ghelardi *et al.*, 2002 ; Haque et Russell, 2005 ; Lereclus *et al.*, 2004 ; McCabe-Sellers et Beattie, 2004 ; Svensson *et al.*, 2004 ; Ultee et Smid, 2001).

Dans la plupart des cas, les maladies d'origine alimentaire causées par *B. cereus* sont associées à une quantité comprise entre 5 et 8 log bactéries vivantes (voire de spores capables germer et produire des toxines) par gramme de vecteur alimentaire. Cependant, lors de quelques épidémies, des concentrations moins importantes ont été signalées dans la nourriture (3 à 4 log par gramme) (Andersson, *et al.*, 1995).

II.1.2.1. - La Toxine émétisante

Qualifiée d'émétique en raison de son action sur les centres nerveux contrôlant le vomissement (Ultee et Smid, 2001). La maladie peut être confondue avec celle provoquée par l'entérotoxine staphylococcique. La toxine émétique affecte spécifiquement les primates. Cette toxine semble être produite pendant la phase de sporulation, aucun rapport clair entre la sporulation et la production de cette dernière n'a été démontré (Sutherland *et al.*, 1996). La toxine émétique est appelée cereulide, c'est un peptide cyclique (Hansen et Hendriksen, 2001), qui se compose d'une répétitions de quatre aminés (D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val)₃ (Toh *et al.*, 2004). Chimiquement, on la lie étroitement à l'ionophore de la valinomycine (Prüß *et al.*, 1999).

La cereulide est préformée, c'est-à-dire qu'elle se trouve dans l'aliment au moment où celui-ci est consommé (Radhika *et al.*, 2002). Assez stable, elle est présente dans les aliments après la disparition des souches de *Bacillus*. Elle résiste à 126°C pendant 90 mn (Sutherland *et al.*, 1996) ou à 4°C pendant 2 mois. Elle n'est pas affectée par les valeurs de pH de 2 à 11. La trypsine et la pepsine ne sont pas capables de la dégrader. La mise en évidence de la toxine dans l'aliment est difficile. Les souches productrices de cette toxine, peu présentes dans les aliments, forment un groupe

homogène (Lereclus *et al.*, 2004) contrairement à celles productrices d'agents diarrhéiques. De même, les spores des souches capables de produire la toxine émétique sont parmi les plus résistantes. Les *B. cereus* émétiques sont incapables de proliférer et de produire leur toxine cereulide en dessous de 10°C ou en l'absence d'oxygène.

II.1.2.2. - Les Entérotoxines

On parle aussi d'agent diarrhéique, de facteur d'accumulation de liquide, de facteur de perméabilité vasculaire, de toxine dermonécrotique et de toxine intestino-nécrotique (Radhika *et al.*, 2002). Les toxines diarrhéiques semblent être produites pendant la phase de croissance exponentielle dans la nourriture ou dans le petit intestin (Sutherland *et al.*, 1996 ; Ultee et Smid, 2001). Elles sont nécrosantes et nécessitent la présence de glucose, avec un pH compris entre 6,0 et 8,5 (optimum à 7,0 – 7,5), une température de 10 à 48°C voire 4°C pour les espèces psychrotrophes (avec un optimum vers 31-34°C). Elles sont connues pour ne pas être thermostables (Ultee et Smid, 2001). A titre d'exemple, il est connu qu'en dessous de pH 6,5 et en aérobiose aucune production de HBL (entérotoxine hémolytique) n'intervient (Beattie et Williams, 2002 ; Ghelardi *et al.*, 2002).

L'entérotoxine la mieux caractérisée est la toxine HBL (H pour hémolysine, B pour binding component et L pour lytic component) (Prüß *et al.*, 1999). Cette toxine est constituée d'une partie responsable de l'attachement (B d'un poids moléculaire 38 000 daltons) et de deux unités lytiques, L1 (poids moléculaire 38 500 daltons) et L2 (poids moléculaire 43 200 daltons). La synthèse de HBL est sous la dépendance d'un opéron composé de quatre gènes : *hbIC* (codant L2), *hbID* (codant L1), *hbIA* (codant pour B) et *hbIB* dont la fonction est inconnue. Cette toxine est hémolytique, dermonécrotique, elle augmente la perméabilité des capillaires et elle provoque une accumulation de liquide lorsqu'elle est administrée dans une anse intestinale ligaturée de lapin. La toxine HBL aurait un rôle prépondérant dans la pathogénie des diarrhées.

Un autre gène d'entérotoxine, *bceT*, a été cloné et séquencé (Prüß *et al.*, 1999). La toxine BceT, codée par le gène *bceT*, a un poids moléculaire de 41 000 daltons. Elle est cytotoxique, elle augmente la perméabilité capillaire, elle provoque une accumulation de liquide lorsqu'elle est administrée dans une anse intestinale de souris

ligaturée, mais elle n'est pas hémolytique. Cette toxine est dépourvue de séquence signal et elle n'est libérée qu'après une lyse des cellules bactériennes.

Outres ces deux entérotoxines, *B. cereus* produit une autre entérotoxine de trois composants, appelé NHE. La toxine NHE (Non-Haemolytic Enterotoxin) est constituée d'un composant NheA similaire au composant L2 de la toxine HBL et codé par le gène *nheA*, d'un composant NheB similaire au composant L1 et codé par le gène *nheB*. L'opéron *nhe* porte également le gène *nheC* qui pourrait coder pour une protéine similaire au composant B de la toxine HBL. La toxine NHE est aussi cytotoxique que la toxine HBL, mais elle est non hémolytique (Prüß *et al.*, 1999).

L'intoxication alimentaire de type diarrhéique est liée aux propriétés de virulence de la bactérie, de la quantité ingérée, de l'état physiologique du sujet qui conditionne la croissance et la survie de la bactérie. La virulence est soumise à un système de régulation centrale, *PlcR* (figure 1). Le régulon *PlcR* contrôle environ 80% de l'ensemble des protéines sécrétées (hémolysines, entérotoxines et enzymes dégradatives) par la bactérie. La toxine diarrhéique est principalement produite en fin de phase exponentielle et elle est active en début de phase stationnaire (Lereclus *et al.*, 2004 ; Ultee et Smid, 2001).

Pour être actif, le régulon requiert la présence du *PapR* (Peptide activant *PlcR*). Son inactivation conduit à une forte diminution du pouvoir pathogène. La lyse de la cellule n'est pas nécessaire pour la production de la toxine. Toutefois, une grande partie de la toxicité semble être perdue après la phase exponentielle de croissance. La toxine est instable entre 4 et 25°C ; elle est complètement inactivée par chauffage à 56°C pendant 5 mn. Elle est sensible à la trypsine et à la pronase. La toxine agit en stimulant le système AMP cyclique-adenylate cyclase, elle provoque l'accumulation liquidienne dans l'intestin. Elle est de plus cytotoxique.

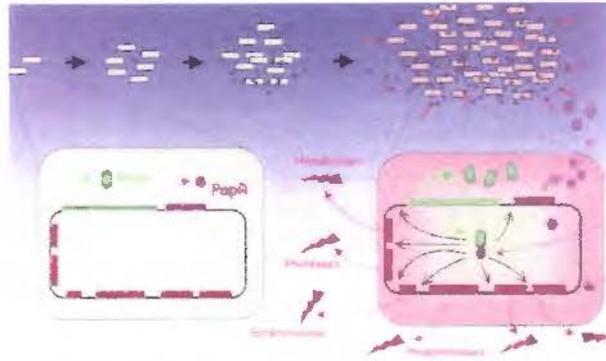


Figure 1 : Schéma de la régulation de l'expression de facteurs de virulence chez *Bacillus cereus* par quorum-sensing (Lereclus *et al.*, 2004)

II.1.2.3. - Le syndrome diarrhéique

Une diarrhée aqueuse et profuse, des douleurs abdominales suivent de 6 heures à 15 heures la consommation des plats contaminés (10 heures d'incubation en moyenne) (Hansen et Hendriksen, 2001 ; Sutherland *et al.*, 1996). L'incubation peut démarrer après 1 heure dans certaines conditions. Les vomissements sont très rares, la nausée est parfois ressentie. Les syndromes disparaissent en moins de 24 heures.

II.1.2.4. - Le syndrome émétique

La nausée, les vomissements surviennent après 1/2 à 6 heures d'incubation (Hansen et Hendriksen, 2001 ; Sutherland *et al.*, 1996). Occasionnellement des douleurs abdominales, de la diarrhée accompagnent les vomissements. Les symptômes subsistent 6 à 24 H.

II.1.3. - Les aliments responsables

La toxine émétique semble associée à la consommation de riz frit alors que les entérotoxines sont reliées à la consommation de viande. On peut aussi citer d'autres aliments comme la salade, la purée de pommes de terre, la volaille cuite au barbecue, la viande hachée, les haricots en salade, le saucisson de foie, la pâtisserie, la sauce à la vanille, le pudding, les potages et les bouillons de légumes, les légumes cuits et divers plats cuisinés et assaisonnements, les épices, les céréales (Sutherland *et al.*, 1996 ; Giffel *et al.*, 1996 ; Toh *et al.*, 2004). Le lait, la poudre de lait écrémé, la crème pasteurisée sont parfois contaminés par *Bacillus cereus*. Les contaminations interviennent lors des différentes étapes de fabrication depuis la matière première

jusqu'aux produits finis (Haque et Russell, 2005 ; Sutherland *et al.*, 1996 ; Svensson *et al.*, 2004).

Des études récentes ont montré que la population bactérienne se situerait plutôt entre 10^3 - 10^9 bactéries ingérées pour qu'elle soit impliquées dans les cas de infections alimentaires (Andersson *et al.*, 1995 ; Lereclus *et al.*, 2004).

Des souches de *Bacillus subtilis* et *Bacillus licheniformis* ont été isolées dans des aliments à base d'agneaux et de poulets dans des épisodes de TIA.

II.1.4. - L'isolement et l'identification

Les *Bacillaceae* cultivent en général sur Gélose ordinaire (GO) en aérobiose et sur milieu sélectif comme le milieu Mannitol Yolk Polymyxin (ou milieu de Mossel). Outre les caractères généraux du genre *Bacillus*, les souches de *Bacillus cereus* sont des bacilles à Gram positif ou à Gram variable, aux extrémités arrondies, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche, d'une longueur supérieure à 3 μm et d'un diamètre moyen de 1,4 μm , souvent groupés en chaînes, formant des spores non déformantes, ovales (ou parfois cylindriques), en position subterminale (ou parfois en position paracentrale), dépourvus de corps parasporal, aéro-anaérobies, catalase positive (Guiraud, 1998 ; Manafi, 2000).

La galerie d'identification biochimique la plus simple est composée de : Gélose Ordinaire (un disque de Pénicilline G sera placé dans la zone de la boîte de Pétri possédant la plus grande densité bactérienne) ; milieu viande foie (VF), CTA glucosé ; galerie API20E ou/et API 50CH de préférence ; milieu au jaune d'oeuf (recherche de la lécithinase) (Guiraud, 1998 ; Sarrias *et al.*, 2002 ; Schulten *et al.*, 2000 ; Shinagawa, 1990 ; te Giffel *et al.*, 1996). L'utilisation des milieux de culture chromogènes et fluorogéniques est de plus en plus utilisée pour la détermination de caractères spécifiques. A titre d'exemple, nous pouvons citer le cas des milieux basés sur la détection de la présence de la phospholipase C. Le substrat fluorogénique est le 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-myoinositol-1-phosphate. Un tel milieu inhibe non seulement la croissance des autres espèces de *Bacillus* mais aussi des autres bactéries qui pourraient croître sur un autre milieu pour *Bacillus* sauf *B. cereus* et *B. thuringiensis*. Sur ce milieu, *Bacillus cereus* forme des colonies mates plates de couleur turquoise avec et sans des halos turquoise (Guiraud, 1998 ; Manafi, 2000).

II.2. - Les entérobactéries

La famille des *Enterobacteriaceae* ou bactéries entériques (du grec *enterikos*, appartenant à l'intestin) comprend de nombreux genres bactériens répondant à la définition suivante : Bacilles à Gram négatif de 2 à 3 micromètres de long sur 0,6 micromètre de large, aéro-anaérobies, mobiles ou immobiles, facilement cultivables, fermentant le glucose, réduisant les nitrates en nitrites, dépourvus d'oxydase. Les propriétés métaboliques des entérobactéries sont très utiles à la caractérisation des genres (Guiraud, 1998 ; Prescott *et al.*, 1995).

Les espèces les plus communément isolées appartiennent aux genres *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Erwinia* (généralement phytopathogènes), *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Yersinia* (Tableau 3).

Les *Proteus* sont très polymorphes : formes longues et filamenteuses ou petits bacilles droits. Les espèces mobiles - les plus nombreuses - le sont grâce à une ciliature péritriche. Certaines entérobactéries sont immobiles (*Klebsiella*, *Shigella*, *Yersinia pestis*). Les *Klebsiella* sont capsulées. La plupart des espèces pathogènes pour l'homme possèdent des *fimbriae* ou pili communs qui sont des facteurs d'adhésion (Guiraud, 1998).

Sur milieu gélosé, les colonies sont lisses et régulières et peuvent atteindre 2 millimètres de diamètre sauf celles des *Yersinia* qui sont plus petites. Les *Proteus* ont tendance à envahir la gélose et former un tapis uniforme. Les *Klebsiella* forment des colonies souvent très muqueuses, larges, grasses et luisantes. En milieu liquide, les entérobactéries occasionnent un trouble uniforme du bouillon (Guiraud, 1998). Les entérobactéries opposent une résistance naturelle à une variété d'antibiotiques (pénicillines, vancomycine etc...). Certaines d'entre elles sont naturellement résistantes à d'autres molécules : les *Proteus* et *Serratia* à la colistine, les *Klebsiella* et *Levinea* à l'ampicilline. Ces résistances étant naturelles définissent des phénotypes dits "sensibles" ou "sauvages".

Les entérobactéries sont des bacilles à Gram négatif et possèdent donc une paroi dont la structure en trois couches est particulière à celles-ci. Cette paroi est constituée de

l'extérieur vers l'intérieur : d'une membrane externe, d'une couche mince de peptidoglycane et d'un espace péri-plasmique qui entoure la membrane cytoplasmique (Guiraud, 1998; Prescott *et al.*, 1995).

La membrane externe protège les entérobactéries de l'action des sels biliaires et des ferments digestifs. Elle est constituée d'une double couche lipidique dans laquelle sont incluses des molécules de lipopolysaccharide (LPS) qui comprennent 3 parties : le lipide A qui est l'endotoxine, le core central, polysaccharide de base (constituant l'antigène R), les polysides des chaînes latérales (constituant les antigènes O) (Prescott *et al.*, 1995).

On trouve aussi des protéines diverses dont les porines (Omp pour Outer membrane protein) qui, en se polymérisant, forment des canaux assurant le passage des molécules hydrophiles à travers cette membrane externe par ailleurs très hydrophobe (Prescott *et al.*, 1995).

II.2.1. - Les caractères biochimiques

Les propriétés qui définissent la famille doivent être mises en évidence pour affirmer que l'espèce est une entérobactérie. Les caractères d'identification sont essentiellement "biochimiques" et utilisent des tests qui étudient le métabolisme protéique (présence d'uréase, production d'indole, dégradation du tryptophane) ou la fermentation des sucres (glucose, lactose, saccharose etc...), la capacité d'utiliser le citrate, la présence d'enzymes (décarboxylases, désaminases), la production d'hydrogène sulfuré ou la formation de gaz.

Le tableau 3 et la figure 3 résument les caractères d'identification des genres le plus fréquemment rencontrés.

Tableau 3 : Quelques caractéristiques des genres représentatifs sélectionnés parmi les *Enterobacteriaceae*

Caractéristiques	<i>Escherichia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Proteus*</i>	<i>Yersinia**</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Serratia</i>
Rouge de méthyl	+	+	+	+	+	+	(+) ^a	(-) ^b	+	d ^c
Voges-Proskauer	-	-	-	-	D	-(37°C)	(+)	+	(+)	+
Production indole	(+)	D	-	d	D	D	d	-	(-)	(-)
Utilisation citrate	-	-	(+)	+	D	(-)	(+)	+	(+)	+
Production H ₂ S	-	-	(+)	d	(+)	-	-	-	(+)	-
Uréase	-	-	-	(+)	+	D	(+)	(-)	-	-
β-galactosidase	(+)	D	d	+	-	+	(+)	+	(+)	+
Gaz - glucose	+	-	(+)	+	+	(-)	(+)	(+)	(-)	d
Acide - lactose	+	-	(-)	d	-	(-)	(+)	(+)	d	d
Phénylalanine désaminase	-	-	-	-	+	-	-	(-)	(-)	-
Lysine décarboxylase	(+)	-	(+)	-	-	(-)	(+)	d	-	d
Ornithine décarboxylase	(+)	D	(+)	(+)	D	D	-	(+)	-	d
Mobilité	D	-	(+)	+	+	-(37°C)	-	+	+	+
Liquéfaction gélatine (22°C)	-	-	-	-	+	(-)	-	d	d	(+)
% G + C	48-52	49-53	50-53	50-52	38-41	46-50	53-58	52-60	50-58	53-59
Autres caractéristiques	1,1-1,5 sur 2,0-6,0 μm ; péritriches si mobiles	Pas de gaz à partir des sucres	Flagelles péritriches	1,0 sur 2,0- 6,0 μm ; péritriches	0,4-0,8 sur 1,0-3,0 μm ; péritriches	0,5-0,8 sur 1,0-3,0 μm ; péritriches si mobiles	0,3-1,0 sur 0,6-6,0 μm ; capsulés	0,6-1,0 sur 1,2-3,0 μm ; péritriches	0,5-1,0 sur 1,0- 3,0 μm ; péritriches ; pathogènes de plantes et saprophytes	0,5-0,8 sur 0,9-2,0 μm ; péritriches ; colonies souvent pigmentées

^a(+) généralement présent ; ^b(-) généralement absent ; ^cd variation entre espèces ou espèces dans la possession de ce caractère

**Providencia* est souvent groupé avec *Proteus* ; **biochimiquement, *Yersinia* est proche de *Proteus* (Guiraud, 1998 ; Prescott *et al.*, 1995)

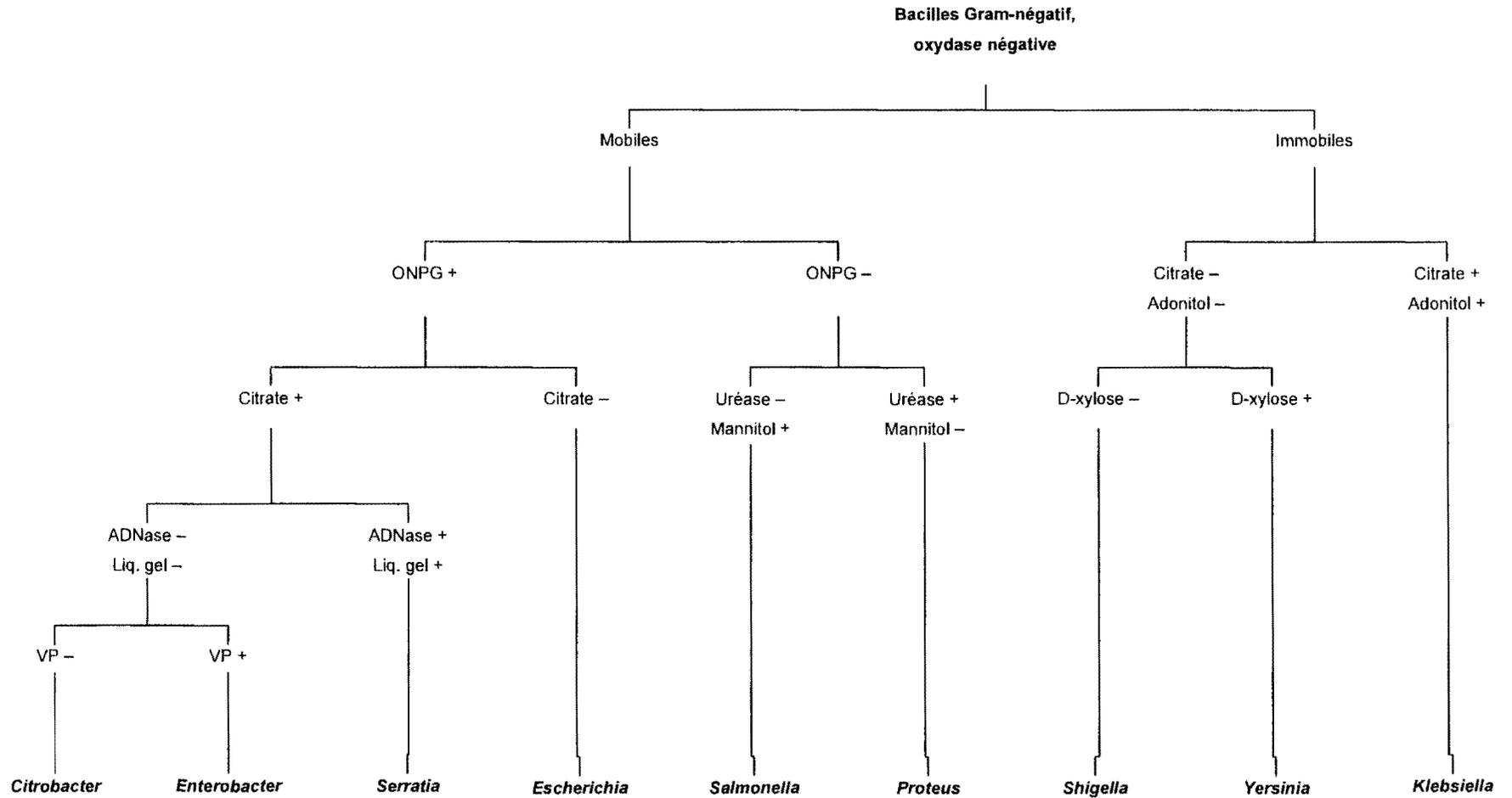


Figure 2 : Clé d'identification biochimique des principaux genres entérobactériens.

On utilise les abréviations suivantes : ONPG, o-nitrophényl-β-D-galactopyranoside (un test pour la β-galactosidase) ; ADNase, désoxyribonucléase ; Liq. gel, liquéfaction de la gélatine ; VP, Voges - Proskauer (un test pour l'acétone) (Prescott *et al.*, 1995)

II.2.2. – Les caractères antigéniques

Les entérobactéries portent différents antigènes (Guiraud, 1998; Prescott *et al.*, 1995) :

- un antigène commun dénommé ECA (pour Enterobacterial Common Antigen) ou antigène de Kunin. Cet antigène n'existe que chez les entérobactéries et, de ce fait, a un intérêt taxonomique. Sa présence chez les *Yersinia* a permis d'inclure ce genre dans la famille des entérobactéries.

- les antigènes O ou somatiques, correspondent aux polyosides fixés sur les lipopolysaccharides (LPS). Ils sont thermostables et résistent à l'alcool. Les bactéries portant des antigènes O sont agglutinées par les anticorps correspondants ; les agglutinats sont fins, lents à se constituer et difficilement dissociables par agitation (agglutination "corps à corps"). Notons les réactions croisées fréquentes entre les antigènes d'*E. coli* et *Salmonella*, en particulier les sérotypes O111 et O35.

- l'antigène R : La disparition de l'antigène O le démasque et rend les espèces "rough" (colonies rugueuses) auto-agglutinables dans l'eau physiologique, plus sensibles aux substances bactéricides du sérum, plus facilement phagocytées et donc moins pathogènes.

- les antigènes H ou flagellaires n'existent que chez les espèces mobiles. Constitués de protéines spécifiques dénommées flagellines, ils sont thermolabiles et inactivés par l'alcool. Ils provoquent une agglutination floconneuse (accolement des bactéries par leurs flagelles), rapidement constituée mais facilement dissociable par agitation (rupture des flagelles).

- les antigènes de surface comprenant : les antigènes K, capsulaires, de nature polysaccharidique. Chez les espèces *Escherichia coli*, *Shigella* ou chez certaines espèces de *Salmonella* et de *Citrobacter* (alors appelés Vi), ils masquent l'agglutination par les anticorps anti O qui peut être restituée après chauffage de l'espèce car ils sont détruits par ébullition.

- Les antigènes d'adhérence ou adhésines de nature protéique, portés par des pili communs (encore appelés fimbriae).

II.2.3. - *Escherichia coli*

La bactérie a été isolée en 1885 par Theodor von Escherich et est couramment appelée "colibacille" (Bach *et al.*, 2002). Elle est l'hôte normal de l'intestin de l'homme et des animaux. C'est l'espèce aérobie la plus représentée dans le tube digestif. La présence d'espèces d'*E. coli* ou d'espèces voisines (les coliformes qui fermentent le lactose) dans l'eau est un témoin de contamination fécale et le dénombrement des coliformes dans l'eau est appelée "colimétrie" (Rompré *et al.*, 2002 ; González *et al.*, 2003).

Définir phénotypiquement *E. coli* serait dire qu'un *E. coli* est une Entérobactérie fermentant le lactose et produisant de l'indole (Guiraud, 1998 ; Rompré *et al.*, 2002). Toutefois, des biotypes ont pu être définis en utilisant la capacité des espèces à fermenter le dulcitol, le raffinose et le sorbose et à décarboxyler l'ornithine (ODC). D'autres caractères tels que la fermentation du rhamnose, l'hydrolyse de l'esculine, la présence d'une activité lysine décarboxylase, la mobilité à 24 h, la production de pili, l'auxotrophie en nicotinamide, en thiamine et autres facteurs de croissance, permettent d'affiner cette classification.

E. coli forme des colonies rouges de plus de 0,5 mm de diamètre en 48 h à 30 ou 37°C sur milieu au désoxycholate citrate lactose. Les espèces d'*E. coli* fermentent le lactose dans le bouillon bilié lactosé au vert brillant en produisant du gaz mis en évidence dans une cloche de Durham (Guiraud, 1998 ; Rompré *et al.*, 2002). Les espèces d'*E. coli* O157, ne cultivent pas à 44°C, et ne possèdent pas de β -glucuronidase et ne fermentent pas le sorbitol (Guiraud, 1998).

Les méthodes d'identification biochimiques classiques permettent dans la majorité des cas la caractérisation rapide d'*E. coli*. Les tests utilisés sont la production d'indole à partir du tryptophane, le type de métabolisme fermentatif mis en évidence par deux réactions, le rouge de méthyl, le test de Voges Proskauer et la capacité à utiliser le citrate comme unique source de carbone (Guiraud, 1998)

II.2.3.1. - Les différents sérotypes d'*E. coli*

Escherichia coli est un genre bactérien dans lequel on ne retrouve qu'une seule espèce ; mais il existe plus de 1 000 types antigéniques. Ces sérotypes sont définis selon leurs antigènes somatiques O (171), capsulaires K (80) et flagellaires H (56). De plus, les ag K sont subdivisées en types A, B ou L. Le type B est rencontré exclusivement dans les espèces associées aux diarrhées infantiles. Le tableau 4 résume sommairement les sérotypes communément rencontrés chez les espèces d'*E. coli* (Gänzle *et al.*, 1999 ; Olsvik *et al.*, 1991).

En ce qui concerne le pouvoir pathogène, plusieurs mécanismes physiopathologiques sont en cause selon les souches responsables (Bach *et al.*, 2002 ; Guiraud, 1998).

Les souches enteroaggrégatives (EAggEC) sont impliquées dans des diarrhées persistantes aiguës. Ce sont, soit des souches LAEC (Localised adherent *E. coli*) responsables de diarrhées non sanglantes, soit des souches DAEC (Diffusely adhering *E. coli*) et des espèces EAggEC (enteroaggrégative *E. coli*) qui donnent des diarrhées persistantes chez les enfants.

Les souches entérohémorragiques : EHEC (Enterohaemorrhagic E*sch*erichia coli) (O157 mais aussi O26 et O111) représenté par *E. coli* O157:H7. Ce sérotype peut se multiplier à 5°C. La dose infectieuse est très faible par rapport à d'autres souches entéropathogènes, soit 1000 bactéries vivantes environ, mais des cas de toxi-infections pour des doses de deux bactéries dans 25 g d'aliment ont été rapportées (Bell, 2002 ; Guiraud, 1998). Les souches EHEC sont responsables de diarrhées sanglantes et de colites hémorragiques liées à la production de toxines SLT (Abdulmawjood *et al.*, 2003). Le syndrome hémolytique et urémique (anémie, thrombopénie et anémie hémolytique) serait dû aux lésions que produisent ces toxines sur les endothéliums des capillaires. Les EHEC proviennent principalement de la nourriture et de l'eau souillées par contact avec des animaux et/ou des personnes portant ces espèces. On peut limiter voire empêcher les contaminations en utilisant des procédés de production bien-contrôlés telles que de bonnes pratiques d'hygiène, de nettoyage et l'utilisation de la pasteurisation (Bach *et al.*, 2002).

Les souches entéroinvasives EIEC (Enteroinvasive E*sch*erichia coli) (O28, O112, O124, O136, O143, O144, O147, O152). Ces espèces (très voisines des shigelles par leurs caractères biochimiques et antigéniques) sont responsables de syndromes dysentériques avec invasion de la muqueuse intestinale. Cette pathologie ressemble à celle causée par les shigelles. Il y a d'ailleurs des difficultés de différenciation entre ces souches et les souches de *Shigella*, en particulier pour les sérotypes O124, immobiles et non gazogènes (Bagamboula *et al.*, 2004 ; Olsvik *et al.*, 1991 ; Watterworth *et al.*, 2005). Ces sérotypes portent tous les deux un plasmide mis en évidence par des sondes ADN codant pour porte les gènes nécessaires à la synthèse du facteur de virulence (Olsvik *et al.*, 1991 ; Prescott *et al.*, 1995 ; Watterworth *et al.*, 2005). Ces souches sont responsables de dysenteries et de diarrhées dans les pays tropicaux.

Les souches entéro-pathogènes : EPEC (Enteropathogen E*sch*erichia coli) (O26, O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O128, O142) (Guiraud, 1998 ; Prescott *et al.*, 1995), sont responsables de gastro-entérites infantiles, selon un mécanisme physiopathologique imparfaitement élucidé. Ces souches adhèrent à la surface des entérocytes sans les envahir. Elles sont proches des sérotypes entérohémorragiques (EHEC) car elles produisent les toxines SLT qui seraient responsable des lésions (Anand and Griffiths, 2003; Nyatoti *et al.*, 1997 ; Olsvik *et al.*, 1991). Des infections croisées sont aussi observées. Leur incidence reste importante dans les pays en voie de développement.

Les souches Neonatal Meningitis *E. coli* (NMEC) : impliquées dans des cas de méningites néonatales (Gurtler *et al.*, 2005). Les raisons de la grande sensibilité des nourrissons à ces bactéries ne sont pas actuellement connues mais sont très certainement liées à des facteurs internes de l'hôte plutôt que des facteurs de la bactérie (Prescott *et al.*, 1995).

Les souches Uropathogenic *E. coli* (UPEC) sont impliquées dans des infections du tractus urinaire très fréquentes.

Tableau 4 : Les différents pathovars d'*Escherichia coli*

Pathovars		Selle hémorragique	Selle liquide ou pâteuse	Selle dysentérique	Maladie	toxines
EIEC	Entero invasive <i>E. coli</i>			n	diarrhée aqueuse suivie d'une dysenterie (elles sont mucopurulentes et fréquentes), crampes abdominales, syndrome fébrile, ténésmes*	<ul style="list-style-type: none"> • cytotoxines différentes des Shigatoxines • cytotonines différentes des LT et ST (Enteroinvasive <i>E. coli</i> (EIEC))
EPEC	Enteropathogenic <i>E. coli</i>		n		diarrhée aqueuse souvent prolongée (deux semaines), fièvre, vomissements.	<ul style="list-style-type: none"> • pas de toxine Shigella like ou très peu
EHEC	Entero-haemorrhagic <i>E. coli</i>	n			diarrhée aqueuse profuse puis hémorragique, colites fébriles, hématies et leucocytes dans les selles. Risque de syndrome urémique et hémolytique.	<ul style="list-style-type: none"> • forte production de cytotoxine de type Shigatoxine.
ETEC	Entero-toxigenic <i>E. coli</i>		n		diarrhée aqueuse peu fébrile, nausées, crampes abdominales	cytotonines LT et/ou ST
EAggEC	Entero-aggregative <i>E. coli</i> ; nombreux sérogroupes	n (certains)	n		diarrhée de longue durée souvent plus de 15 jours	<ul style="list-style-type: none"> • toxine thermosensible non hémolytique proche de l'hémolysine • toxine thermorésistante EAST I
DAEC	Diffuse Adherent <i>E. coli</i> ; nombreux sérogroupes		n		diarrhée de 8 à 15 jours, fièvre et vomissements.	

*Ténésmes : "Tension douloureuse avec sensation de brûlure et envies continuelles d'aller à la selle ou d'uriner, éprouvées au niveau de l'anus ou du col de la vessie" (Guiraud, 1998; Prescott *et al.*, 199

De plus en plus, la classification suivante est adoptée :

- EHEC ou *E. coli* entérohémorragiques sont des souches ayant les mêmes caractéristiques cliniques, épidémiologiques que les O157:H7 et qui possèdent les mêmes facteurs de virulence. Le syndrome hémolytique et urémique ou SHU représente la complication la plus grave des infections à EHEC.
- STEC ou *E. coli* producteurs de Shiga-toxines (ou Shiga-toxin-producing *E. coli*) représentent toutes les souches de *E. coli* possédant les gènes *stx* codant une Shiga-toxine (anciennement Shiga-like toxine) ou vérotoxine (toxine détruisant les cellules Vero). les STEC sont des pathogènes émergents, mais tous les STEC ne sont pas associés à une maladie humaine.
- VTEC ou *E. coli* producteurs de vérotoxines (ou Verotoxin-Producing *E. coli*) ancienne dénomination encore utilisée.

II.2.3.2. - Les enzymes (hémolysines)

- Alpha-hémolysine : Elle est thermolabile et codée par un plasmide ou un chromosome. Les souches *E. coli* alpha-hémolytiques sont fréquemment isolées des sujets ayant une maladie diarrhéique. L'alpha-hémolysine est plasmidique. Elle a un déterminisme chromosomique. Elle forme des pores dans la membrane des hématies provoquant la fuite ionique tandis que les protéines cytoplasmiques sont retenues. L'eau pénètre dans la cellule à cause de la différence de pression osmotique. Il s'en suit un gonflement et finalement un éclatement de l'hématie. Les ions calcium sont nécessaires à l'action (Guiraud, 1998).
- Entero-hémolysine : Cette hémolysine est peu connue. Les souches *E. coli* productrices de vérotoxines et les EHEC synthétisent dans 90% des cas cette hémolysine. L'entéro-hémolysine est une protéine de la membrane externe de la bactérie, apparaissant surtout en fin de croissance. Elle agit en formant des pores dans la membrane de l'hématie. Sa production est liée à la présence d'un phage. On peut la considérer comme un facteur supplémentaire de la virulence des souches EHEC (Guiraud, 1998).

II.2.4. - Les autres entérobactéries (cf Tableau 4 et Figure 3)

II.2.4.1. - *Citrobacter-Levinea*

Ce sont des entérobactéries ayant en commun la capacité d'utiliser le citrate comme unique source de carbone

Leur taxonomie est complexe (Guiraud, 1998) :

- *Citrobacter freundii* est l'espèce type.
- *Citrobacter koseri* (anciennes appellations : *Levinea malonatica*, *Citrobacter diversus*)
- *Levinea amalonatica* est aussi appelé *Citrobacter amalonicus*

Les *Citrobacter* sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux. Les *Levinea* sont des bactéries de l'environnement. Ces souches peuvent être éventuellement des pathogènes opportunistes.

II.2.4.2. - *Klebsiella-Enterobacter-Hafnia-Serratia*

Ces entérobactéries sont souvent désignées sous le sigle "KEHS". Elles utilisent, pour la fermentation des sucres, une voie métabolique qui produit de l'acétyl-méthyl-carbinol ou acétoïne mise en évidence par la réaction de Voges Proskauer ou VP. De ce fait, les KEHS sont dites VP+. Toutefois, ce caractère phénotypique n'est pas exclusif à ce groupe ni d'ailleurs absolument constant.

II.2.4.2.1. *Klebsiella*

Les *Klebsiella* sont des entérobactéries immobiles et capsulées. On distingue 5 espèces dans le genre qu'on peut différencier par des caractères biochimiques :

- *Klebsiella pneumoniae*, comprenant 2 sous espèces : *ozaenae* et *rhinoscleromatis*
- *Klebsiella oxytoca*
- *Klebsiella planticola*
- *Klebsiella terrigena*
- *Klebsiella ornithinolytica*

L'espèce type est *Klebsiella pneumoniae*.

Les *Klebsiella pneumoniae* forment, sur milieux solides, de grosses colonies muqueuses, luisantes. Elles possèdent des antigènes K, capsulaires utilisables comme marqueurs épidémiologiques. Elles sont très répandues dans la nature (eaux, sols). Ce sont aussi des commensales du tube digestif des animaux et de l'homme qui peut également en héberger dans l'oropharynx (Cissé *et al.*, 1997 ; Nejjari *et al.*, 2000).

Elles sont responsables d'infections respiratoires (*Klebsiella pneumoniae* est appelée "pneumobacille de Friedlander").

II.2.4.2.2. - *Enterobacter*

Ce sont des entérobactéries VP + comprenant plusieurs espèces :

- *Enterobacter cloacae* est l'espèce type
- *Enterobacter aerogenes*
- *Enterobacter agglomerans*
- *Enterobacter gergoviae*
- *Enterobacter sakazakii*

Les *Enterobacter*, présents dans l'environnement, sont également des commensaux du tube digestif. Ce sont des pathogènes opportunistes. Il est parfaitement reconnu que la présence d'*Enterobacter sakazakii* dans le lait infantile en poudre peut être associée aux manifestations d'une forme rare de méningite infantile, de nécroses entérocolites, de décès, et de bactériémies du nouveau-né. Ce microorganisme a été isolé dans un éventail d'aliments comprenant le fromage, la viande, les légumes, les grains, les herbes et les épices (Iversen *et al.*, 2004 ; Iversen et Forsythe, 2004). Cette bactérie possède une enzyme α -galactosidase contrairement aux autres *Enterobacter*.

II.2.4.2.3. - *Hafnia alvei*

Bactéries de la flore digestive humaine et animale et présentes dans l'environnement (Duffy *et al.*, 1999). *Hafnia* est souvent confondue avec *Salmonella* car les caractères biochimiques sont voisins mais l'action lytique de bactériophages spécifiques permet de les distinguer.

II.2.4.2.4. - *Serratia*

Les *Serratia* sont des entérobactéries VP+. Elles sont très protéolytiques et liquéfient la gélatine, et elles produisent une lipase. On distingue dix espèces dans le genre mais seule l'espèce type, *Serratia marcescens* est fréquemment isolée chez l'homme. Les autres espèces sont des bactéries de l'environnement présentes sur les plantes, champignons ou mousses, dans l'eau, les sols et chez les mammifères (Gill et Holley, 2000). Longtemps considérée comme un saprophyte, *Serratia marcescens* se comporte de plus en plus souvent comme une souche pathogène opportuniste (Sickbert-Bennett *et al.*, 2005).

II.2.4.3. - *Salmonella*

Les Salmonelles sont lactose -, β -galactosidase -, uréase -, indole -, H₂S +, citrate +. La température optimale de croissance est de 35/37°C cependant les Salmonelles peuvent se multiplier de 5°C à 45/47°C avec une croissance nettement retardée par les températures inférieures à 10°C. La pasteurisation à 72°C/15 secondes assure leur destruction dans le lait, de plus, la contamination dans le lait demeure rare du fait de l'acidité. Selon la nature des aliments, des variations peuvent s'observer. La destruction de 10⁷ *Salmonella* dans des rôtis de bœuf de 5 kg environ requiert des couples temps/température de : 72,2°C/5min ; 68°C/12 min ; 57,2°C/37 min ; 54,4°C/121 min (van Immerseel, *et al.*, 2003). Elles supportent une gamme de pH allant de 4,5 à 9,0 avec un optimum de 6,5 à 7,5. Les *Salmonella* résistent parfaitement à la dessiccation et se développent bien dans des valeurs d'a_w aux environs de 0,9 (Beal, *et al.*, 2002). La réfrigération permet la survie des *Salmonella*, la congélation n'est pas de nature à provoquer leur disparition complète (Guiraud, 1998). Les salmonelles constituent un genre ne contenant qu'une seule espèce : *Salmonella enterica* divisée en 7 sous-espèces. Pour des raisons historiques, car pendant longtemps les sérovars ont été assimilés à une espèce, on désigne chaque sérovar par un nom rappelant soit son pouvoir pathogène (*Salmonella choleraesuis*) soit le nom de la ville du premier isolat (ex : *Salmonella* London). Les réactions chimiques permettent de classer les salmonelles en trois espèces : *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis* (*enterica*, depuis 1986) et *Salmonella enteritidis*.

Le schéma de KAUFFMAN-WHITE, utilisant les critères biochimiques et surtout sérologiques, permet de subdiviser ces espèces en sérotypes, selon leurs antigènes O et H. Le seul antigène K reconnu chez les *Salmonella* est l'antigène Vi (de virulence ou de surface), qui peut exister chez Typhi, Paratyphi C et Dublin. La présence de l'antigène Vi masque l'agglutination "O". Il convient de l'éliminer pour révéler la présence des antigènes somatiques (1 Heure à 60°C). L'antigène Vi de certaines salmonelles n'est pas un antigène de virulence. Il est possible de définir également les lysotypes et des types basés sur les profils plasmidiques et des profils de restriction

Actuellement, la classification est basée sur les sérotypes (ou sérovars) et définit deux espèces : *Salmonella choleraesuis* (*S. enterica*) qui est divisée en sous-espèces correspondant aux groupes de Kauffmann (subsp *choleraesuis*, *salamae-arizonae*, *diazonaehoutenae* et *indica*) et *Salmonella bongori*. La plupart des espèces isolées chez l'homme ou les animaux à sang chaud appartiennent à la sous-espèce I *Salmonella choleraesuis* subsp *choleraesuis*.

Les salmonelloses peuvent donner lieu à trois types d'infections :

Des formes bactériémiques, strictement humaines, qui sont les fièvres typhoïde et paratyphoïde dues à *Salmonella* Typhi, Para A, Para B et Para C. Ce sont des bactériémies à point de départ lymphatique.

Des toxi-infections alimentaires donnant lieu à des gastro-entérites dues à tous les autres sérovars mais également à Para B et C.

Des manifestations extra-digestives dans lesquelles divers sérovars sont en cause. Elles sont plus fréquentes chez les sujets fragilisés.

Les sérovars responsables de gastro-entérites sont très répandus dans le monde animal et les animaux domestiques ou d'élevage sont à l'origine des contaminations humaines. L'infestation se fait par voie digestive, par consommation d'aliments souillés consommés peu cuits : laitages, viandes, œufs, coquillages, crudités etc...

Il faut ingérer, en générale, beaucoup de microorganismes pour qu'il y ait maladie (10^5 à 10^7 bactéries) ; beaucoup sont éliminées par des voies gastro-intestinales. La durée des symptômes est de 1 à 7 jours, et la guérison est sans complication. Seulement *Salmonella typhi* est toujours dangereuse à très faible dose : un seul germe peut suffire

à provoquer une typhoïde. La multiplication des microorganismes dans les intestins (tube digestif), ainsi que la sécrétion de toxines, produisent des symptômes de gastro-entérite aiguë. L'irritation et l'inflammation des intestins sont provoquées par une infection profonde des muqueuses de l'iléon et du côlon. Après quelques jours, les germes disparaissent de la muqueuse mais pullulent dans les ganglions mésentériques ; ils peuvent être parfois isolés à partir du foie et de la rate mais jamais du sang. Les germes pénètrent davantage dans la profondeur de la muqueuse ; leur multiplication dans la sous-muqueuse donne naissance à des foyers inflammatoires avec abcès et extension aux formations lymphoïdes du côlon (Prescott *et al.*, 1995).

Certaines salmonelles peuvent franchir la barrière intestinale et provoquer des troubles viscéraux divers : arthrite, septicémie, méningite, péricardite, endocardite, etc. (*S. senftenberg*), leucopénie (baisse du nombre des globules blancs), ostéomyélite, mais en général les bactéries restent localisées au niveau de l'intestin.

Les *Salmonella* ne sont pas toxigènes mais entéro-invasives. Après adhésion à la bordure en brosse, elles provoquent la rupture des microvillosités et envahissent les entérocytes par un processus d'endocytose induit par l'attachement de la bactérie à son récepteur (RME, receptor-mediated endocytosis). À l'intérieur de la vacuole de phagocytose, la bactérie migre au pôle apical et est expulsée vers la *lamina propria* où elle induit une réponse inflammatoire. Les espèces de *Salmonella typhimurium* attirent les macrophages, se font phagocyter et sont capables de s'y multiplier (Prescott *et al.*, 1995).

II.2.4.4. - *Shigella*

Les *Shigella* sont immobiles. Elles sont génotypiquement très voisines des *Escherichiae*. Les caractères biochimiques et antigéniques permettent de distinguer 4 espèces ou groupes antigéniques dans le genre : *Sh. dysenteriae* (groupe A), *Sh. flexneri* (groupe B) (Tetteh and Beuchat, 2003 ; Tetteh *et al.*, 2004), *Sh. boydii* (groupe C), *Sh. sonnei* (groupe D) (Bagamboula *et al.*, 2004).

Les shigelles sont des bactéries strictement humaines. Elles ne font pas partie de la flore intestinale normale ; on ne les trouve que chez les malades, les convalescents et les rares porteurs sains (Guiraud, 1998). Les humains constituent leur réservoir naturel.

La période d'incubation varie de 12 heures à 7 jours. La dose infectieuse peut être de 10 à 100 shigelles (Sackey, *et al.*, 2001).

Elles sont responsables de l'historique "dysenterie bacillaire" (*Shigella dysenteriae*). Toutes les shigelles possèdent une endotoxine glucido-lipido-polypeptidique. *S. dysenteriae* provoque le syndrome le plus sévère de la maladie car elle secrète une endotoxine glucido-lipido-protéique avec des propriétés neurotoxiques et entérotoxiques. Cette toxine est de nature glucido-lipido-protéique qui n'est autre que l'antigène O ; elle est soluble, thermolabile et a une action entérotrope.

Des exotoxines de faible poids moléculaire, à activité cytotoxique et entérotoxique sont produites par *S. sonnei* et *S. flexneri*, c'est un poison vasculaire entraînant des lésions intestinales et nerveuses, possédant un pouvoir toxique élevé. Il existe des espèces hybrides de *S. flexneri* qui détiennent le pouvoir invasif mais sont incapables de se multiplier dans la muqueuse ; elles produisent une réaction inflammatoire transitoire dans les tissus infectés mais le processus infectieux n'évolue pas (Guiraud, 1998).

II.2.4.5. - Proteus-Providencia

Ce sont des bactéries de l'environnement et des commensaux de l'intestin de l'homme et des animaux (Manafi and Rotter, 1991). Ce groupe comprend les genres : *Proteus* avec les espèces *mirabilis*, *vulgaris* et *penneri*, *Morganella* avec l'espèce *morganii*, *Providencia* avec les espèces *stuartii*, *rettgeri*, *alcalifaciens* et *rustigianii* (Manafi and Rotter, 1991).

Toutes ces bactéries sont mobiles et produisent des désaminases (tryptophane désaminase et phénylalanine désaminase). Les espèces de *Proteus* produisent en outre une uréase. Certaines espèces de *Proteus* (*mirabilis* et *vulgaris*) envahissent la surface des milieux gélosés en formant des halos de cultures en ondes concentriques à partir du point d'inoculation (Manafi and Rotter, 1991).

Ce sont des bactéries de l'environnement et des commensaux de l'intestin de l'homme et des animaux (Manafi and Rotter, 1991).

II.2.4.6. - *Yersinia*

Anciennement appelées *Pasteurella*, les *Yersinia* ont été rattachées à la famille des entérobactéries car elles en possèdent les caractéristiques génomiques. Ce sont de petits bacilles à Gram négatif, à coloration bipolaire, cultivant sur milieux ordinaires ou sur milieux spéciaux pour entérobactéries (milieu Salmonella Shigella) mais en formant des petites colonies. Elles possèdent une uréase mais pas de désaminases. Dans certains cas, les caractères biochimiques d'identification s'expriment mieux à 20°C qu'à 37°C. Les principales espèces du genre sont *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Yersinia enterocolitica* (Manafi and Rotter, 1991 ; Vannini *et al.*, 2004).

II.2.5. – L'effet de la température

La cuisson, malgré les changements dans la texture, en élevant la température de l'aliment s'avère être un excellent moyen d'amélioration de la qualité hygiénique des aliments (Blackburn *et al.*, 1997 ; Buchanan et Edelson, 1999). La cuisson réduit la population en entérobactéries car leur optimum de croissance se situe à 37°C (bactéries mésophiles). Mais une adaptation à des températures de croissance plus élevées (44°C) a permis de distinguer des coliformes "thermotolérants". Des espèces d'*E. coli* O157.H7 résistantes aux traitements thermiques peuvent se développer dans des plages de température comprises entre 52°C et 62°C (Buchanan et Edelson, 1999). L'effet de la température sur les entérobactéries est amélioré en présence de sels (Blackburn *et al.*, 1997). Le barème appliqué doit tenir compte de la résistance des germes en présence (Buchanan et Edelson, 1999), de la population initiale et des conditions du milieu. Ainsi, un environnement acide, tels que les aliments fermentés, améliore l'effet de la température (Ryuand et Beuchat, 1999).

II.2.6. – L'effet du pH

L'acidification est l'un des plus vieux procédé utilisé dans la prévention du développement des germes pathogènes dans les cas de TIAC (Toxi-infections alimentaires collectives) (Cheng *et al.*, 2003). Il est parfaitement établi que l'acidité des aliments de complément fermentés (pH<4,5) protège de la prolifération des germes pathogènes (Molina *et al.*, 2005). Cependant, certaines bactéries entériques telles que *E. coli*, *Shigella flexneri*, *S. typhimurium* (Gänzle *et al.*, 1999 ; Ryuand et Beuchat, 1999) possèdent une forte capacité d'adaptation au stress acide (Ryuand et Beuchat,

1999 ; Tetteh *et al.*, 2004). Ce phénomène protégerait aussi les espèces concernées contre le stress osmotique et l'élévation de température (Ryuand et Beuchat, 1999 ; Tetteh *et al.*, 2004). Rien donc d'étonnant de les rencontrer très souvent comme contaminants des aliments fermentés. Leur prédisposition à survivre dans un environnement acide est parfaitement établie (Gänzle *et al.*, 1999).

II.2.7. – Les résistances des entérobactéries à la nisine et aux huiles essentielles

Parmi les bactériocines, la nisine est le seul composé utilisable en alimentation. Elle est active sur les bactéries Gram positif (Cintas *et al.*, 1998). Mais un traitement modifiant la composition de la membrane externe des bactéries Gram négatif (Abee *et al.*, 1995 ; Gänzle *et al.*, 1999) améliore leur action sur cette catégorie de germes (Cleveland *et al.*, 2001). Les agents de chélation comme l'EDTA (acide éthylène-diamine-tétracétique) combiné soit à des traitements thermiques, soit à la congélation en dégradant le LPS, accroît ainsi l'effet de la nisine sur les espèces de *Salmonella enterica* et d'*E. coli* (Gänzle *et al.*, 1999). La combinaison d'un pH acide et de concentration en NaCl supérieures à 5% (w/w) de (Kuwano *et al.*, 2005) augmente une efficacité de la nisine sur les entérobactéries (Gänzle *et al.*, 1999).

Les huiles essentielles telles que le carvacrol, le thymol, l'estragol, etc...inhiberaient le développement des entérobactéries (Bagamboula *et al.*, 2004 ; Burt, 2004). L'effet est bactériostatique voire bactéricide pour certaines entérobactéries.

II.2.8. – La détection et dénombrement des coliformes

II.2.8.1. - Les Méthodes classiques

Le principe fondamental de ces méthodes est basé sur la capacité des coliformes à fermenter le lactose. Pour ce faire, une série de milieux spécifiques lactosés est inoculée à l'aide de dilutions appropriées et incubé 24-48 heures soit à 30-37°C (coliformes totaux) soit à 44°C (coliformes fécaux). En milieu liquide, le bouillon lactosé bilié au vert brillant avec cloche est souvent préconisé, dans ce milieu les coliformes produisent du gaz. En milieu solide, le milieu Désoxycholate-Citrate-Lactose (milieu de Leifson-Hynes) ou le milieu VRBL (Violet Red Bile Lactose) voir le milieu EMB (Eosine Bleu de Méthylène) sont utilisés fréquemment. La sélectivité de ces milieux est due le plus souvent au désoxycholate de sodium (figure 3) ou aux sels biliaires voir au vert brillant qui inhibent les bactéries Gram positif (Iversen *et al.*, 2004). Les milieux suivant

sont utilisés dans le cas de *salmonella-Shigella* : le milieu Hektoen, le milieu Désoxycholate-Citrate-Lactose-Saccharose (D.C.L.S.), le milieu Xylose-Lactose au Désoxcholate (XLD), le milieu SS, le milieu au sulfite de Bismuth.

Ces milieux permettent une orientation de l'identification des espèces isolées mais nécessitent des tests complémentaires d'identification (González *et al.*, 2003 ; Iversen *et al.*, 2004; Manafi et Rotter, 1991 ; Rompré *et al.*, 2002).



Figure 3 : Aspect des colonies d'*Enterobacter sakazakii* "AMC8-3" sur milieu désoxycholate lactosé ; incubation 37°C °C, 24 heures en aérobose

II.2.8.2. - La recherche de la β -D-glucuronidase

La β -D-glucuronidase est une enzyme qui catalyse l'hydrolyse de l'acide β -D-glucopyranosiduronique en acide D-glucuronoïque et d'autres sous-produits. Cette enzyme prévaut chez *E. coli* a contrario, elle est moins présente chez les autres entérobactéries telles que *Shigella*, *Salmonella* et *Yersinia*.

Les substrats chromogènes et fluorogéniques incolores ou non fluorescents ajoutés à des milieux adaptés, hydrolysés par l'enzyme pour produire des composés colorés ou fluorescents. Pour détecter la présence de la β -D-glucuronidase chez *E. coli*, les substrats chromogènes suivants ont été employés : indoxyl- β -D-glucuronide (IBDG), le complexe mono- β -D-glucuronide de phénol-phtaléine et 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D glucuronide (X-Glu). Le plus fréquemment utilisé est le 4-méthylumbelliferyle β D-glucuronide (figures 4a et 4b). La synthèse de méthylumbellifère due à l'hydrolyse du MUGlu (échantillons positifs) est mise en évidence par exposition des boîtes de Pétri à la lumière UV sur lesquelles fluoresce en bleu les colonies d'*E coli*. (González *et al.*, 2003 ; Manafi et Rotter, 1991).



Figure 4a : Aspect des colonies d'*Escherichia coli* ATCC 25922 sur milieu ECD MUG ;
Incubation 44°C, 24 heures en aérobiose.



Figure 4b : Aspect de colonies d'*Escherichia coli* ATCC 25922 sur milieu ECD MUG sous UV

II.2.8.3. – La méthode Elisa

Une méthode ELISA est mise en œuvre, elle utilise un anticorps monoclonal dirigé contre l'antigène commun enterobactérien (ECA), qui est un lipopolysaccharide localisé dans la paroi des entérobactéries. Pour augmenter la sensibilité de la méthode une pré-culture de l'échantillon dans un bouillon sélectif pour 24 h à 35°C est nécessaire pour que la population soit supérieure à 100 000 UFC /mL, soit la limite de détection. Des auteurs ont rapporté qu'il existerait une activité hétérospécifique avec plusieurs autres bacilles Gram négatifs (*Pseudomonas* et *Aeromonas*) et Gram positifs (*Bacillus*) (Rompré *et al.*, 2002).

II.3. - Les coques Gram positif

II.3.1. - Le genre *Staphylococcus*

Caractéristiques

Les Bactéries du genre *Staphylococcus* sont des cocci de 0,1 à 1 mm de diamètre groupés en amas, en chainettes ou par deux, (Guiraud, 1998). Ce sont des bactéries ubiquitaires qui sont commensaux de l'environnement et saprophyte de la peau et des muqueuses chez l'homme en particulier (Acco *et al.*, 2003 ; Aycicek *et al.*, 2005). Ils persistent dans l'environnement du fait de leur résistance à la dessiccation (Bagge-Ravn *et al.*, 2003), aux variations de température et au choc osmotique (Maraki *et al.*, 2005).

L'espèce la plus pathogène pour l'homme et l'animal est l'espèce *Staphylococcus aureus* (coagulase positive). La plupart des autres espèces de staphylocoques ne sont pas pathogènes ou sinon pathogène opportuniste (Acco *et al.*, 2003 ; Aycicek *et al.*, 2005).

Les espèces incluant des espèces productrices de coagulase libre, dont l'espèce *S. aureus*, sont plus pathogènes que celles qui n'en produisent pas (Aycicek *et al.*, 2005 ; Kunene *et al.*, 1999 ; Wang *et al.*, 1997). Les staphylocoques à coagulase-négative (SCN) sont des pathogènes opportunistes (Aycicek *et al.*, 2005). L'espèce *S. epidermidis* à coagulase-négative est fréquemment rencontrée au cours de ces infections. Les espèces de l'espèce *S. saprophyticus* ne produisant pas la coagulase font exception puisqu'elles provoquent des infections urinaires chez les jeunes femmes.

S. aureus est au deuxième rang des bactéries responsables d'infections alimentaires en France, après les salmonelles (Borge *et al.*, 2001). Les infections alimentaires sont des troubles digestifs provoqués par l'ingestion d'aliments contenant l'entérotoxine préformée, d'incubation très courte (une heure à six heures après le repas) et évoluant sans fièvre.

Le principal réservoir est la peau et les muqueuses de l'homme, qu'il soit malade ou bien-portant puisqu'on trouve, parmi les sujets indemnes de toute infection, 30 à 50% de porteurs sains. On le trouve en particulier dans les narines. C'est une affinité du germe pour l'épithélium nasinaire et le pouvoir d'y adhérer durablement qui explique sa

prévalence dans le nez. La transmission manuportée est le mode essentiel de transmission et le réservoir nasal récontaminant rapidement les mains assure la pérennité de la transmission. Le portage intestinal est assez fréquent et n'a pas beaucoup de signification pathologique.

Ces germes sont capables d'adhérer aux corps étrangers tels les ustensiles de cuisine (Kusumaningrum *et al.*, 2003). Lorsque les mesures d'hygiène ne sont pas respectées et lorsque les porteurs ne sont pas isolés, les staphylocoques provoquent de véritables infections épidémiques. Leur gravité est liée à la sévérité des symptômes (Kusumaningrum *et al.*, 2003 ; McCabe-Sellers et Beattie, 2004).

Les staphylocoques ont été répartis en espèces et sous-espèces qui ont été individualisées grâce à l'analyse du génome (Chen *et al.*, 2004 ; Fontana *et al.*, 2005 ; Morot-Bizot *et al.*, 2003), des constituants de la paroi, des caractères métaboliques (Leuschner *et al.*, 1998 ; Maraki *et al.*, 2005 ; Martín *et al.*, 2004 ; Morot-Bizot *et al.*, 2003) et de la résistance à certains antibiotiques . Certaines de ces espèces sont rencontrées chez l'homme et l'animal (*S. aureus*, *S. haemolyticus*, *S. warneri*, *S. cohnii*, *S. saprophyticus*, *S. xylosus*, *S. simulans*, *S. schleiferi*, *S. pasteurii*, *S. saccharolyticus*); d'autres espèces sont rencontrées plus particulièrement chez l'homme (*S. epidermidis*, *S. hominis*, *S. capitis*, *S. auricularis*, *S. lugdunensis*) ou chez l'animal (*S. hyicus*, *S. sciuri*, *S. lentus*, *S. coprae*, *S. gallinarum*, *S. arlettae*, *S. chromogenes*, *S. delphini*, *S. equorum*, *S. felis*, *S. kloosii*, *S. muscae*, *S. piscifermentans*, *S. vitulus*) (Rantsiou *et al.*, 2005).

On note une grande résistance de ces espèces à très une très large gamme d'antibiotiques (Acco *et al.*, 2003). Les staphylocoques sont sensibles aux bactériocines (Cintas *et al.*, 1998 ; Kuwano *et al.*, 2005) aux huiles essentielles (Burt, 2004). On reconnaît même un effet inhibiteur synergique de carvacrol et du thymol (Burt, 2004).

Les entérotoxines staphylococciques

Les entérotoxines émétisantes dont l'ingestion est responsable d'intoxications alimentaires. Les symptômes apparaissent rapidement (1 à 2 heures, jusqu'à 6 heures); il s'agit au début de salivation abondante, de nausées, de céphalées, de

maux de tête, de vomissements (violents, incoercibles et répétés), sueur, troubles neurologiques (prostration jusqu'à collapsus), fortes douleurs abdominales et de diarrhée sévères (Guiraud, 1998). Il n'y a généralement pas d'élévation forte de température, quelque fois une légère hyperthermie (jusqu'à 38°C), ou au contraire une hypothermie (cas sévères chez les nourrissons et les vieillards). Les cas sévères sont accompagnés de déshydratation et de rejet de sang et de mucus dans les selles et de vomissements. La durée des symptômes est courte 6 à 48 H. La guérison est complète dans presque tous les cas. La guérison des manifestations aiguës survient rapidement (2 à 5 H) mais le manque d'appétit et les diarrhées peuvent continuer pendant 1 ou 2 jours. Chez les très jeunes enfants et chez les individus à résistance diminuée, un état de choc et la mort peuvent survenir à la suite d'une déshydratation brutale que provoquent les vomissements et les diarrhées. Mais les cas sont rares. La mortalité provient également d'accidents cardio-vasculaires résultant essentiellement de vomissements violents. La quantité d'entérotoxine avalée (dans le tube digestif) détermine le moment d'apparition des symptômes, ainsi que leur gravité. Il faut $5 \cdot 10^5$ à $5 \cdot 10^6$ germes/g pour déclencher les troubles. On a expérimenté chez les humains qu'une personne de 70 kg présente des symptômes à partir de 100ng d'entérotoxines ingérés. On estime cependant que chez des sujets sensibles 3,5 ng pourraient être suffisants.

Les entérotoxines sont des métabolites excrétés dans le milieu de culture au cours de la croissance bactérienne. Ce sont des protéines globulaires formées d'une seule chaîne polypeptidique dont le poids moléculaire est compris entre 28 000 et 35 000 daltons. Ces entérotoxines peuvent être considérées comme des neurotoxines. En effet elles activent des récepteurs de la paroi intestinale dont le stimulus parvient jusqu'au centre du vomissement à travers le nerf vague.

On reconnaît au moins 7 entérotoxines différentes, appelées A, B, C1, C2, C3, D, E1 et TSST-1 (Toxic Shock Syndrome Toxin-1 "anciennement F"). Les plus fréquemment impliqués dans les TIAC sont les entérotoxines A et le biotype B serait la deuxième cause L'entérotoxine E est très rarement détectée.

Les entérotoxines sont faiblement antigéniques : 7 entérotoxines ont été purifiées depuis 1959, et identifiées par leur réaction avec des immunosérums spécifiques. Les entérotoxines C1, C2 et C3 possèdent le même site antigénique majeur et sont souvent

regroupées sous la dénomination d'entérotoxine C. Les staphylocoques peuvent produire d'autres entérotoxines non identifiables par une méthode sérologique.

La production d'entérotoxines B et C est codée par des plasmides et s'effectue principalement à la fin de la phase stationnaire de croissance, tandis que la production des entérotoxines A, D et E est sous contrôle chromosomique et survient essentiellement pendant la phase logarithmique de croissance.

Une souche de staphylocoque peut produire 2 ou 3 entérotoxines en même temps. Le gène de structure des entérotoxines est chromosomique. Cependant, certaines espèces ne produisent l'entérotoxine B qu'en présence d'un plasmide qui pourrait être porteur de gènes de régulation ou d'expression. L'entérotoxine B est détruite après exposition à 100°C pendant 90 minutes alors que l'entérotoxine A est détruite à 90°C en une minute (Kusumaningrum *et al.*, 2003)

Les aliments qui facilitent la croissance des staphylocoques sont principalement les pâtisseries à la crème, les crèmes glacées, les aliments traités tels que les jambons, les pâtés et rilette, et les salades de pomme de terre, de volaille et de thon. Les produits cuits contaminés après cuisson (viandes hachées, poissons, tranches de charcuterie). Les produits à teneur en eau réduite (salaisons, poissons séchés et fumés, lait en poudre). Les fromages, à la suite d'une acidification insuffisante du caillé. Les ovoproduits, mayonnaise, produits laitiers (ex. lait concentré), crèmes, glaces.

S. aureus se multiplie plus facilement en aérobiose qu'en anaérobiose. Il exige des acides aminés et des vitamines. Il est mésophile. Il est en général inhibé en présence d'une flore compétitive importante. Il est sensible à l'acidité. Il tolère des concentrations élevées de NaCl et des A_w relativement basses (>0.90). Il survit longtemps dans des aliments déshydratés ou congelés. C'est un germe thermosensible : des populations de 10^6 *S. aureus*/ml peuvent être complètement inactivées en 4-24 mn à 54-60°C (Kusumaningrum *et al.*, 2003).

II.3.2. - Les Streptocoques

Caractéristiques générales

Ce sont des coques aérotolérants associées en chaînettes. Ils appartiennent à la vaste famille des *Streptococcaceae*, ensemble hétérogène de cocci Gram-positif, dépourvus

de cytochrome, de catalase et de nitrate-réductase. De ce fait, leurs besoins énergétiques (synthèse d'ATP) ne sont pas assurés par les voies de la respiration aérobie qui utilise les cytochromes mais par dégradation du glucose par la voie homofermentaire d'Embden-Meyerhof avec pour produit final l'acide L-lactique. Ils sont fortement tolérants à l'acide lactique (jusqu'à pH 5) (Domig *et al.*, 2003a), ce qui leur donne un avantage sélectif sur beaucoup d'autres bactéries.

Du fait de leurs capacités de synthèse limitées, les streptocoques ont des besoins nutritifs complexes pour assurer leur croissance (Domig *et al.*, 2003a). Celle-ci nécessite des milieux riches en protéines (ascite, sang, peptones, extraits de viande) ou en acides aminés, des facteurs de croissance, du glucose et des éléments minéraux. Les streptocoques ne possèdent pas de capsule externe autour de la paroi, sauf chez les formes S (smooth) des pneumocoques, et chez certaines espèces des groupes A et C. Les sept principaux genres sont : *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Aerococcus*, *Gemella*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Lactococcus*.

En général, on les classe en différents types :

- Streptocoques Pyogènes
- S. oraux (dans la bouche)
- Entérocoques (dans l'intestin)
- S. Lactiques ou genre *Lactococcus*

La plupart des streptocoques et des entérocoques appartiennent à la flore normale (commensale) des cavités naturelles (rhino-pharynx, cavité buccale, intestin, voies génitales) et des téguments (Domig *et al.*, 2003a). Certaines espèces sont présentes dans le lait et chez certaines plantes (Domig *et al.*, 2003a). Plusieurs espèces saprophytes ont une importance biotechnologique et sont utilisées comme ferments dans l'industrie des fromages (Franz *et al.*, 2003 ; Guiraud, 1998).

Par leur présence dans la flore microbienne normale de l'Homme, ils jouent un rôle important dans l'équilibre écologique bactérien de l'organisme et dans l'acquisition de l'immunité naturelle non spécifique. Dans des circonstances particulières, ces bactéries commensales peuvent devenir pathogènes et provoquer des infections sévères (Guiraud, 1998).

En milieu liquide, les cultures présentent soit un aspect homogène avec ou sans dépôt (groupes B, D), soit un aspect granulaire avec dépôt et un surnageant clair ou légèrement trouble (groupes A, C, G). Sur milieux solides, on observe de petites colonies (1 mm de diamètre), blanches ou grises d'aspect mat muqueux ou lisse (Domig *et al.*, 2003a ; Domig *et al.*, 2003b ; Guiraud, 1998).

Les streptocoques ont en commun leur résistance à certains agents antimicrobiens : azoture de sodium, cristal violet, acide nalidixique, polymyxines. Cette résistance constitue un caractère taxonomique précieux du genre *Streptococcus* et permet l'utilisation de milieux sélectifs.

Les Antigènes polysidiques de groupe (classification de Lancefield)

Le groupage d'un streptocoque après isolement est indispensable pour la signification pathologique éventuelle du germe. Actuellement, la classification la plus utilisée reste basée sur les travaux de Rebecca Lancefield. Elle est fondée sur la présence ou l'absence des dix-neuf marqueurs antigéniques classiques distincts (groupes A, B, C, D, E, F, G, H, K, L, M, N, O, P, R, S, T et U et V liés à la présence du polyside C pariétal, excepté pour les groupes D et N dont les antigènes spécifiques de groupe sont des acides téichoïques).

Sur la base de la détermination des antigènes du groupe, la quarantaine d'espèces et de sous-espèces du genre *Streptococcus* sont réparties en trois catégories : les streptocoques «groupables», les streptocoques «ingroupables» et les streptocoques «déficients» (*S. adjacens* et *S. defectivus*) classés à part en raison de particularités liées à leurs besoins nutritionnels et à certaines caractéristiques métaboliques.

L'hémolyse sur milieux solides

Certains streptocoques ont la capacité de sécréter des hémolysines capables de lyser les érythrocytes de l'homme et de diverses espèces animales. Cette propriété est en effet un test présomptif important d'identification sur milieu gélosé contenant du sang de mouton ou de cheval (Tableau 5). Elle permet de différencier les streptocoques en trois classes selon l'aspect de la lyse autour des colonies : streptocoques β -hémolytiques (zone large de lyse franche), α -hémolytiques (zone étroite de lyse floue

et partielle et coloration verdâtre du milieu) et non hémolytiques (NH). La typicité hémolytique des streptocoques est utile pour orienter le diagnostic mais reste insuffisante car une même espèce peut comporter des variétés ou même des espèces à pouvoir lytique différent. Toutefois, les streptocoques β -hémolytiques doivent être systématiquement identifiés quelle que soit la source biologique dont ils ont été isolés.

Tableau 5 : Récapitulatif des caractères dominants de la famille des *Streptococcaceae*

Espèce bactérienne présumée	Aspect macroscop. sur milieu au sang	Aspect microscopique	Caract. de référence		
			Oxydase	Catalase	Respiration
<i>Strep. α-hémolytique</i>	Très fines colonies grises Hémolyse a (verte)	Cocci en chaînettes parfois très longues			
<i>Strep. β-hémolytique</i>	Colonies très fines Hémolyse b	Cocci en chaînettes parfois très longues			
<i>Strep. pneumoniae</i>	Fines colonies, parfois muqueuses dites « en goutte de rosée », ou légèrement creusées au centre. Hémolyse a	Cocci en chaînettes, diplocoques en flamme de bougie, courtes chaînettes, parfois en agglutinats sur culture riche (lyse)			AAF
<i>Enterococcus sp.</i>	Colonies grises, de taille moyenne, parfois a hémolytique	Cocci courtes chaînettes, un peu allongés	-	-	
<i>Aerococcus sp.</i>	Colonies blanches, fines, hémolyse a	Cocci en amas, en tétrades			MA
<i>Leuconostoc sp.</i>	Colonies fines, blanchâtres, non hémolytiques	Cocci à coccobac, parfois en chaînes courtes, diplo ou amas			AAF
<i>Pediococcus sp.</i>	Colonies fines, blanchâtres, non hémolytiques	Cocci en amas, en paires ou en tétrades			MA

Les caractéristiques biochimiques

L'identification complète des streptocoques groupables et non groupables ou des différentes espèces à l'intérieur d'un groupe repose sur la mise en jeu d'une batterie de tests (Muyanja *et al.*, 2002). Ce sont par exemples la fermentation de divers sucres permettant de différencier les streptocoques (Langa *et al.*, 2003 ; Manero and Blanch, 1999) en plusieurs biotypes, l'action sur certains substrats comme le tellurite de potassium, l'aptitude à se multiplier dans des conditions hostiles (croissance en milieu hypersalé par exemple), la sensibilité à divers agents antibactériens (Domig *et al.*, 2003a ; Domig *et al.*, 2003b), etc. Une classification encore largement acceptée, fondée sur une combinaison des trois types de critères cités précédemment distingue les catégories suivantes : streptocoques pyogènes (essentiellement β-hémolytiques), pneumocoques, entérocoques (résistant à 6,5% de NaCl) (Domig *et al.*, 2003a), streptocoques lactiques, streptocoques viridans (dépourvus d'antigène de groupe).

S. pyogenes, groupe A strictement associé à l'espèce humaine, est responsable de la majorité des infections streptococciques chez l'homme qui apparaissent soudainement 12 à 24 heures après ingestion d'une population élevée de bactéries ($> 10^8$). Les symptômes ne durent que 3 jours en général. Ce sont des angines affectant surtout les enfants de 5 à 15 ans et des infections cutanées multiples. Cette bactérie n'est pas répertoriée comme responsable de TIA.

Les streptocoques du groupe B sont des commensaux de l'intestin, du vagin, de l'urètre (chez l'homme) et des voies respiratoires supérieures. Des infections sévères entraînant de fortes fièvres sont décrites chez le nouveau-né et chez l'adulte.

Les Streptocoques du groupe D (*S. bovis* et *S. equinus*) sont des commensaux de l'intestin humain et animal. *S. bovis* est un agent responsable de septicémies et d'endocardites ; l'association fréquente de ces deux infections aux cancers gastro-intestinaux est maintenant bien connue. *S. bovis* est aussi responsable de méningites et d'infections néonatales.

Les Pneumocoques, dont l'espèce *Streptococcus pneumoniae* (autrefois *Diplococcus pneumoniae*) est le représentant, constituent l'agent principal de la pneumonie et de diverses infections (méningites, arthrites, otites, péritonites, septicémies).

La classification des neuf espèces du genre *Enterococcus* est désormais relativement bien établie grâce aux techniques d'hybridation ADN-ADN et à différents critères biochimiques (Domig *et al.*, 2003a). Autrefois, elles étaient classées dans le groupe D de *Streptococcus* sous le générique de « streptocoques fécaux » (Sinton *et al.*, 1993a ; Sinton *et al.*, 1993b) car utilisées comme indicateurs de contamination fécale de l'eau. Cependant, ce sont de mauvais indicateurs de contaminations fécales récentes car on les rencontre en abondance dans l'environnement et peuvent y séjourner longtemps (car résistants aux stress physiques) apportant du coup un biais dans l'appréciation (Domig *et al.*, 2003a). Des espèces responsables d'infections chez l'homme, *E. faecalis* est de loin le plus prépondérant. Elle est essentiellement localisée dans l'intestin de l'adulte sain (Klein, 2003). On les trouve également dans le vagin et la cavité buccale, y compris parmi la flore de la plaque dentaire (Domig *et al.*, 2003a). Sur le plan infectieux, 10^8 - 10^{10} bactéries sont nécessaires (Guiraud, 1998) pour être

impliqués dans des endocardites bactériennes, d'infections du tractus génito-urinaire, de bactériémies, d'infections néonatales, du système nerveux, intra-abdominales et nosocomiales (Domig *et al.*, 2003a).

II.4. - Les bactéries anaérobies

Il s'agit d'un ensemble très complexe de bactéries ayant certaines caractéristiques écologiques, biochimiques et pathologiques. La flore cutanée est caractérisée par les genres *Propionibacterium* et *Peptostreptococcus*. La flore bucco-pharyngée est associée aux genres *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Eubacterium*, *Actinomyces*. Les voies digestives sont colonisées par les genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*.

II.4.1. - La caractérisation et l'identification

La caractérisation passe par une étude de la mobilité entre lame et lamelle, une coloration de Gram, la recherche d'une oxydase et d'une catalase, la croissance en présence d'antibiotiques (kanamycine, colistine, vancomycine) ou d'inhibiteurs (bile, vert brillant), l'étude de la fermentation des sucres (Eisgruber *et al.*, 2000), de la production d'indole et d'une gélatinase à l'aide d'une galerie miniaturisée, l'étude des caractères enzymatiques grâce à une galerie d'identification rapide. (API 20A, Rapid ID 32A) (Eisgruber *et al.*, 2000 ; Guiraud, 1998 ; Mead, 1985)

L'identification est le plus souvent biochimique. L'isolement nécessite des milieux gélosés, contenant de nombreux facteurs de croissance et rendus sélectifs grâce à l'addition d'antibiotiques (de Jong *et al.*, 2003). Il est important de toujours utiliser des milieux désoxygénés (régénérés), fraîchement préparés et conservés en anaérobiose avant leur utilisation. Différents milieux ont été proposés. Pour les *Clostridium*, les milieux TSC (tryptose sulfite cycloserine) – avec ou sans supplément fluorogénique tel que 4-methylumbelliferylphosphate comme substrat pour la détection de l'acide phosphatase - et TSN (Araujo *et al.*, 2004 ; Eisgruber *et al.*, 2003), l'utilisation de milieux chromogéniques (Manafi, 2000), le milieu au jaune d'œuf et néomycine, le milieu Columbia au sang avec cyclosérine et cefoxitine pour *C. difficile*. Certaines bactéries peuvent avoir des difficultés à se développer sur un milieu au sortir d'un environnement stressé. Il faut toujours associer un bouillon anaérobie à un milieu gélosé. Ce bouillon est repiqué après 48 à 72 heures sur des milieux sélectives (Mead, 1985).

II.4.2. - *Clostridium perfringens*

II.4.2.1. – Les caractères morphologiques, culturels, biochimique et sérologiques

Cette bactérie présente un habitat mixte : c'est un bacille anaérobie stricte très répandue dans l'environnement (sol, eau, air, poussières), mais c'est aussi un commensal des flores de l'intestin, du vagin ou des voies aériennes supérieures de l'homme et des animaux. Capable de tolérer une semi-anaérobiose, il contamine fréquemment certains aliments (viande, lait, fruits, légumes) et sa présence dans les eaux est un critère de contamination fécale ancienne (Eisgruber *et al.*, 2003).

L'espèce *Cl. perfringens* est divisée en 5 sous-types notés de A à E. C'est un bacille Gram positif aux extrémités carrées, isolés ou groupés par paire, anaérobie strict. Il cultive très bien entre 37°C et 46°C (Sikes and Ehioba, 1999). L'absence de mobilité, la présence de capsule, la faible capacité de sporuler *in vitro* en font des clostridies à part. Les spores sont ovales en position centrale ou subterminale. Elles peuvent résister plusieurs heures à 100°C (cuisson des aliments) (Kang *et al.*, 1969 ; Kunene *et al.*, 1999). Un choc thermique est nécessaire pour la germination.

Les formes végétatives sont thermolabiles et hémolytiques. Elles sont inactivées après 10 minutes à 100°C. Elles se multiplient lorsque des aliments cuits sont conservés à des températures se situant entre 4°C et 60°C (de Jong *et al.*, 2004). C'est pourquoi la source de la toxi-infection pour l'être humain est constituée par des aliments contenant des spores ayant résisté à la cuisson (Kalchayanand *et al.*, 2004). La contamination des aliments par des spores peut se produire après la cuisson (Brynstad and Granum, 2002; de Jong *et al.*, 2004)

Les composés antimicrobiens tels que la nisine possède une action inhibitrice sur cette bactérie (Guerlava *et al.*, 1998 ; Jamuna *et al.*, 2005 ; Meghrous *et al.*, 1999), il en est de même des acides organiques et des sels de sodium (Juneja et Thippareddi, 2004).

II.4.2.2. - Les toxi-infections alimentaires à *Cl. perfringens*

Clostridium perfringens type A est l'une des causes principales de toxi-infections alimentaires humaines (Kunene *et al.*, 1999). *C. perfringens* type C (anciennement appelé *Clostridium welchii*) provoque des entérites nécrosantes (Brynstad et Granum, 2002).

C. perfringens produit une toxine dans le tractus intestinal des personnes qui consomment des aliments fortement contaminés par cette bactérie. La population de *Clostridium perfringens* ne doit pas dépasser la valeur limite de 10^5 UFC/g de denrées alimentaires non prêtes à la consommation, et 10^4 UFC/g pour les denrées alimentaires prêtes à la consommation. Après ingestion d'aliments contaminés par *C. perfringens*, 10 germes par gramme d'aliment suffisent à déclencher les symptômes. (Granum, 1990 ; Huang, 2003). Le pouvoir pathogène repose sur la synthèse d'entérotoxines résistantes aux enzymes intestinales. Les symptômes consistent en de fortes crampes abdominales et une diarrhée très gazeuse. Les symptômes apparaissent habituellement de 8 à 24 heures après l'ingestion d'aliments contaminés. Ils peuvent durer d'un à deux jours, mais des symptômes plus légers peuvent persister pendant une à deux semaines (Brynstad et Granum, 2002). Les infections alimentaires à *Clostridium perfringens* sont très fréquentes (Granum, 1990). Les plats incriminés sont essentiellement les aliments de nature protéique dont le stockage a été trop long, les viandes mal cuites, les plats refroidis puis réchauffés (la bactérie survit sous forme de spore).

Les différentes toxines produites sont la toxine alpha, bêta, epsilon et iota. Ces toxines possèdent toutes un effet cytotoxique et nécrosant. Outre ces quatre toxines principales, les espèces du *C. perfringens* produisent une série d'autres toxines, dont l'entérotoxine, un polypeptide de 35 kDa, agent pathogène très important pour l'homme. L'intoxication alimentaire provoquée par cette entérotoxine de *C. perfringens* (CPE) est connue depuis longtemps. En absorbant des aliments mal conservés et en particulier déjà cuits, de grandes quantités de *C. perfringens* sont absorbées. Celles-ci entraînent la formation de grandes quantités de toxines et une infection intestinale en résulte, accompagnée de diarrhée et de crampes abdominales (Brynstad et Granum, 2002 ; Guiraud, 1998).

III - L'analyse globale des flores microbiennes à l'aide de méthodes moléculaires :

III.1. - La PCR-DGGE

La technique PCR (*Polymerase Chain Reaction*) est basée sur le fonctionnement cyclique d'une ADN polymérase effectuant la copie d'un brin monocaténaire à partir d'amorces. Il s'en suit une amplification de séquence qui est visualisée par révélation au bromure d'éthidium (Ercolini, 2004).

La DGGE a été développée depuis 1993, par Muyzer pour étudier l'écologie microbienne (Brüggemann *et al.*, 2000). Actuellement, la technique est parfaitement éprouvée dans le typage des communautés complexes dans différentes matrices telles que les sols, l'eau, les échantillons cliniques, le tractus gastro-intestinal (Ercolini, 2004). Elle combine une étape d'amplification génique enzymatique par PCR à une électrophorèse en gel de polyacrylamide (Brüggemann *et al.*, 2000 ; Ercolini, 2004). Dans le cas des aliments fermentés, Ampe *et al.*, (1999) ont analysé les flores bactériologiques du *pozol*, un aliment mexicain à base de maïs fermenté. Leurs travaux ont permis de connaître les variations de flores au cours du processus de fermentation et de comparer cette technique aux méthodes culture dépendante classiques. La DGGE enrichi les informations relatives à l'écosystème microbien du produit en permettant de mettre en évidence la présence de espèces microbiennes viables mais difficilement cultivables, ou présentes à des niveaux de population trop faibles.

L'utilisation de la PCR-DGGE dans l'industrie fromagère (Ercolini, 2004) a apporté des éclaircissements sur le rôle des micro-organismes lors des différentes transformations du produit. Les auteurs, ont mis aussi en évidence, la particularité des profils obtenus en liaison avec les lieux de fabrication. Il en ressort que la DGGE pourrait être utilisée pour déterminer l'origine de produits alimentaires.

La PCR-DGGE est basée sur la mise en évidence de la variabilité du génome des micro-organismes, en particulier dans le gène codant pour les ARN ribosomiques 16 S dont à identifier des séquences conservées et des séquences variables. .

III.2. - Les autres techniques

La TGGE permet de séparer des séquences d'ADN qui diffèrent par des modifications infimes (théoriquement une paire de bases) de la séquence étudiée, soit une substitution, une délétion ou une addition (Ji *et al.*, 2004 ; Miambi *et al.*, 2003). Elle met en jeu les variations de mobilité électrophorétique de fragments double brins d'ADN de même taille dans un gel d'acrylamide soumis à un gradient de température croissant (Manzano *et al.*, 2005). Les conditions dénaturantes croissantes dans le gel, entraîne une dénaturation partielle des fragments amplifiés qui conduit à une diminution brutale de la mobilité. La résistance des fragments est reliée à leur séquence, soit le nombre et la position des bases GC liées par trois liaisons covalentes, alors que les bases AT sont liées par deux liaisons. (Nicolaisen et Ramsing, 2002 ; Ovreas *et al.*, 1997). Les fragments analysés sont relativement courts (de l'ordre de 500 pb). Dans les conditions décrites, les différences de mobilité diminuent avec la longueur des fragments amplifiés (Florez et Mayo, 2006).

L'électrophorèse en champ pulsé (PFGE, *pulse field gel electrophoresis*) permet la réalisation d'une électrophorèse des chromosomes entiers sur gel d'agarose. Il est possible de séparer ainsi les chromosomes en fonction de leur taille. La visualisation est effectuée sous UV après coloration au bromure d'éthidium.

Le polymorphisme de restriction de l'ADN (RFLP, *restriction fragment length polymorphism*) est basé sur hybridation à partir des profils de restriction des ADN codant pour les ARNr. Après culture et isolement de l'ADN, on pratique une restriction, une électrophorèse en agarose et un Southern blot : la détection se fait par hybridation avec une sonde pour séquences répétées, marquée par la biotine ou la digoxigénine et par utilisation d'un anticorps couplé à une enzyme (Guiraud, 1998).

Le polymorphisme d'amplification de l'ADN (RAPD, *random amplification of polymorphic DNA*) utilise des oligonucléotides aléatoires (10 nucléotides) comme amorce de PCR (RAPD-PCR). Après l'amplification, l'analyse est réalisée par électrophorèse suivi de la coloration au bromure d'éthidium.

IV - Les tests de croissance ou challenge-tests

Le Challenge-test est un test de croissance (Vestergaard, 2001). Il apporte des informations supplémentaires par la simulation d'une contamination accidentelle, ciblée, de la matière première ou du produit, survenue au cours de la fabrication ou de la conservation (Notermans et in't Veld, 1994). Mise en œuvre correctement, cette méthode de suivi permet de simuler le comportement de bactéries pathogènes (Rajkovic *et al.*, 2005) ou non pathogènes (flore d'altération, ferments), de levures, moisissures, virus ou autres contaminants dans un produit alimentaire : soit par contamination de la matière première (challenge-test produit), soit après recontamination des surfaces, soit par contamination au cours de la fabrication (challenge-test procédé) ou de la conservation. Ainsi, il est possible de déterminer l'efficacité d'un nouveau traitement, d'un procédé de fabrication, d'un emballage avec simulation ou non des conditions de rupture de chaîne du froid (Uyttendaele *et al.*, 2003). Il s'en suit une comparaison et une validation de l'influence de modifications de procédés, des formules, du traitement thermique, des modèles de microbiologie prévisionnelle. L'efficacité de la démarche repose sur la bonne connaissance des dangers liés au développement des micro-organismes. En ce sens, la microbiologie prévisionnelle permet de connaître l'évolution théorique des flores d'un produit et donc du produit lui-même et de définir les conditions de fabrication et de traitement permettant d'assurer une bonne sécurité. Tout ceci concourt à renforcer la démarche qualité pour l'obtention d'un aliment « sain » (Notermans *et al.*, 1993 ; Wilson *et al.*, 2002).

V - L'approche HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point)

Le système est né aux Etats-Unis (Kvenberg *et al.*, 2000). Il est basé sur l'analyse des dangers à partir des outils qualité, la détermination des points critiques (CCP) pour la maîtrise, la surveillance, la vérification, l'établissement d'un système documentaire. Son aspect complet en fait un moyen recommandé par le *Codex Alimentarius* dans le cadre de l'assurance qualité des produits alimentaires (Scott, 2005; Sperber, 2005a ; van Schothorst, 2005) surtout au cours de l'appréciation de la qualité microbiologique (de Boer and Beumer, 1999 ; Sinell, 1995).

La modélisation (croissance, transformations, destruction des micro-organismes) apporte un concours important à la mise en œuvre de la démarche HACCP en analysant l'impact de telle ou telle étape de fabrication sur la flore, en définissant les valeurs à appliquer pour obtenir un résultat particulier, en remplaçant les analyses microbiologiques effectuées *a posteriori* par la mesure immédiate en ligne de divers paramètres tout en garantissant une bonne sécurité (Guiraud, 1998).

Actuellement la sécurité des denrées alimentaires fait l'objet d'une norme : ISO 22000 : 2005 (AFNOR, 2005). Cette norme est obligatoire pour démontrer la conformité avec les exigences légales et réglementaires applicables en matière de sécurité des denrées alimentaires. Le chapitre 7 (planification et réalisation de produits sûrs) résume les principes de la démarche HACCP. Sept principes la composent. Ce sont (i) l'analyse des dangers, (ii) la détermination des points critiques pour la maîtrise des dangers, (iii) l'établissement des critères opérationnels (valeurs limites, tolérances etc...), (iv) l'établissement du système de surveillance, (v) l'établissement des actions correctives à mettre en œuvre lors d'une déviation, (vi) l'établissement des procédures de vérification et (vii) l'établissement du système documentaire (Sperber, 2005a ; van Schothorst, 2005).

Son application à différentes filières comme le vin, le poisson, les fermes agricoles etc..., (Christaki et Tzia, 2002 ; Hamada-Sato *et al.*, 2005 ; Notermans et Mead, 1996 ; Sperber, 2005b) montre que le système est flexible et adaptable en fonction des objectifs escomptés (Hoornstra *et al.*, 2001 ; Zwietering, 2005). Il a ainsi guidé différents auteurs dans la proposition des voies d'amélioration de la qualité des aliments produits à petite échelle « traditionnelle » (Motarjemi, 2002 ; Motarjemi et Asante, 2002 ; Whyte *et al.*, 2001).

Matériels et Méthodes

Matériels et Méthodes

I - Les bouillies fermentées : mode de fabrication

Des bouillies de type *ben-saalga* et *ben-kida* dont les grandes étapes de préparation sont présentées dans les figures 5 et 6, ont été utilisées dans le cadre de nos travaux. Ces bouillies fermentées présentent plusieurs avantages. Elles sont couramment consommées aussi bien par les adultes que par les jeunes enfants. De consistance assez liquide, de couleur grisâtre, elles sont disponibles en quantités importantes et à des petits prix.

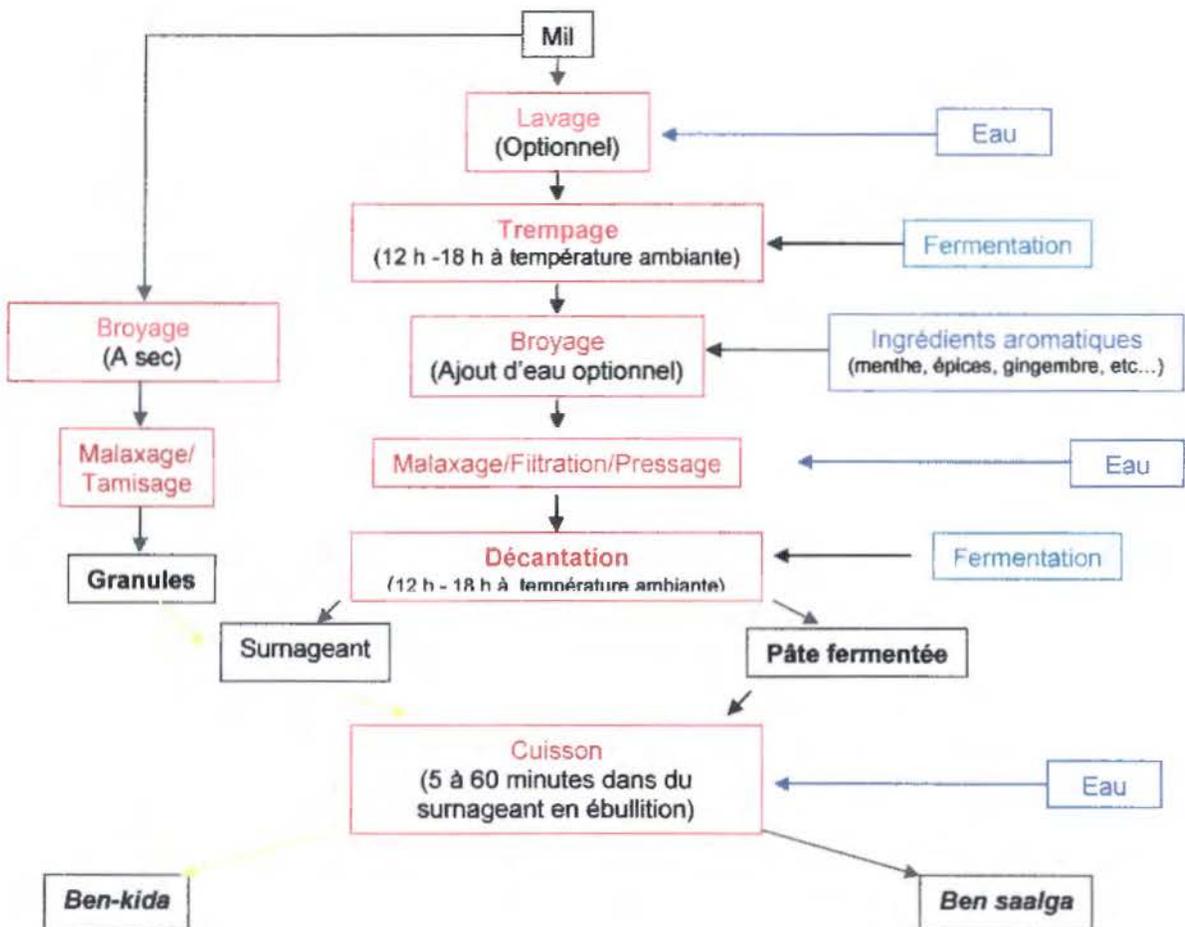


Figure 5 : Schéma des principales étapes de préparation de bouillies de mil de type *ben-saalga* et *ben-kida* à Ouagadougou au Burkina-Faso



a petit mil ; b déchets de lavage ; c trempage ; d lavage des ingrédients aromatiques ; e et f broyage ; g filtration ; h drêches, déchets de filtration ; i cuisson, addition de la pâte fermentée ; j la bouillie pour la vente.

Figure 6 : Photos de la préparation des bouillies dans différents ateliers traditionnels de Ouagadougou au Burkina-Faso

II - La fabrication au laboratoire des pâtes et des bouillies

La fabrication au laboratoire des pâtes et des bouillies suit le même schéma de fabrication que celui décrit précédemment. Elle a été réalisée de façon à minimiser les contaminations apportées par le procédé de fabrication.

Le petit mil de plusieurs variétés du Burkina-Faso (figure 6a) utilisé a été choisi en raison de son importance dans l'alimentation africaine (Council, 2000 ; FAO/WHO, 1995b). Il est lavé avec de l'eau de source de marque EVIAN et mis à tremper à 30°C pendant 18 heures (ratio grains/eau : 1/1,5 m/v) dans un cristalliseur. Pendant le trempage, s'opère une première phase de fermentation.

Après trempage, les grains sont lavés, égouttés par tamisage (mailles 300 µm) puis broyés à l'aide d'un mixeur de marque THERMOMIX (ref 21/2-1, Vorwerk, Suisse) pendant quatre minutes en position turbo. Pour ce faire le récipient de broyage est

rempli de mil jusqu'à la couverture totale des pâles du broyeur et une quantité équivalente d'eau de marque EVIAN est ajoutée. Le produit du broyage est pressé manuellement sur un tamis en inox (mailles 300 µm). Les déchets de matières solides subissent une seconde étape de broyage/pressage. Les particules fines de farines contenant l'endosperme et le germe broyés sont présentes dans la partie liquide (filtrat) et les parties solides (drêches) retenues par le tamis sont éliminées. Le filtrat est mis, soit à décanter à l'étuve à 30°C (± 1°C) durant 18 heures, soit conservé (2 à 7 jours) au réfrigérateur à +4°C (± 1°C) pour un usage ultérieur.

Durant la décantation, une seconde phase de fermentation lactique intervient (la plus importante). Elle s'accompagne d'une baisse du pH de 6,4 à 3,9. La décantation permet de séparer la pâte fermentée du surnageant limpide par simple gravité. La pâte fermentée ainsi produite et le surnageant sont conservés (2 à 7 jours) au réfrigérateur à 4°C (± 1°C). Avant chacune des utilisations lors des différents tests de croissance, la quantité de pâte nécessaire est prélevée puis réchauffée durant 30 minutes à température ambiante (25°C ± 1°C). La température du produit en début de chaque essai est de 21°C (± 2°C).

La cuisson de la pâte fermentée (étape ultime de transformation) est réalisée dans des conditions aseptiques. Deux volumes de surnageant sont portés à 95°C pendant 10 minutes dans un bain marie bouillant agité. On y additionne ensuite un volume de pâte fermentée. Le mélange (à 95°C) est laissé sous agitation durant 10 minutes dans le bain marie bouillant.

III - Les origines et la nature des échantillons de bouillies collectés à Ouagadougou

Les échantillons ont été collectés dans dix ateliers de la commune de Ouagadougou (Figure 7) auprès des productrices de bouillies. Ces 10 ateliers de fabrication de bouillie de petit mil fermenté ont été retenus parmi ceux qui collaboraient déjà avec l'UR 106 de l'IRD Montpellier. Les ateliers sont répartis dans 7 secteurs sur les 30 que compte la commune de Ouagadougou. Le choix des ateliers, pour être le plus représentatif possible, a pris en compte les modes de fabrication des produits qui diffèrent légèrement d'un atelier à un autre (volume produit, broyage humide ou à sec, présence ou absence de granules, durée de fermentation, mode de cuisson, etc....).

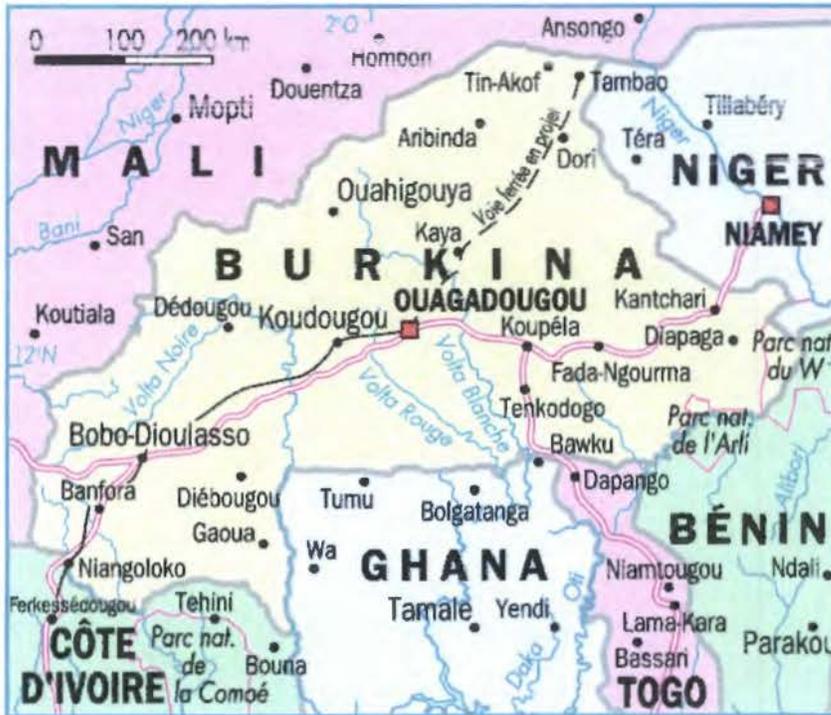


Image dans son contexte original, sur la page www.quid.fr/2006/412_26.htm.

Figure 7 : Carte du Burkina-Faso

Dans chaque atelier, des échantillons ont été prélevés de façon aseptique (près de la flamme, utilisation de sachets stériles) à différentes étapes de la fabrication des bouillies (Figure 5), soit :

- avant la 2^{ème} fermentation (après le malaxage et la filtration correspondant au début de fermentation proprement dite de la pâte) (Figure 8b),
- après la décantation (après avoir retiré le surnageant suivi de l'homogénéisation de la pâte correspondant à la fin de fermentation de pâte) (Figure 8d),
- après la réalisation des granules (utilisées lors de la confection du *ben-kida*) (Figure 8h). Elle débute par le broyage du mil à sec. Ensuite la farine est légèrement humidifiée et malaxée pour obtenir une pâte. Le frottement de la pâte sur un tamis permet de former des granules qui sont récupérées dans un récipient. Ils sont utilisés dans la confection du *ben-kida*. L'ajout se fait dans le surnageant en ébullition avant l'addition de la pâte fermentée,
- après la cuisson de la pâte fermentée (Figure 8f).



Figure 8 : Photos illustrant les points de prélèvement lors des étapes de fabrication des bouillies fermentées dans les ateliers de Ouagadougou

Une première collecte d'échantillons dans 10 différents sites nous a permis d'apprécier le niveau général d'hygiène de production des sites visités. Sur la base des résultats d'analyses microbiologiques lors des premiers prélèvements d'échantillons, nous avons procédé à une deuxième collecte en commençant par les sites jugés extrêmes (le moins et le plus salubre).

Le second passage nous a aussi servi pour l'approche HACCP (AFNOR, 2005) en nous aidant des recommandations du chapitre 7.6 de la norme ISO 22000 : 2005. L'objectif a été de déterminer les points critiques concernant les dangers microbiens liés à la sûreté des denrées alimentaires que sont les bouillies produites dans ces ateliers artisanaux. Pour ce faire les différentes pratiques de fabrication ont été examinées lors de la confection des bouillies.

Le volume des prélèvements est de l'ordre de 100 mL pour les produits liquides et de 100 grammes pour les solides. Ils sont réalisés en conditions aseptiques et placés dans des sachets stériles pour broyeur Stomacher. Ils sont immédiatement scellés et conservés dans des glacières en présence de barres de glaces. Les analyses sont réalisées entre 3 et 4 heures après les prélèvements des échantillons.

La conservation des souches isolées lors de nos investigations est faite soit dans du bouillon nutritif (entérobactéries, staphylocoques, *Bacillus*) soit dans du bouillon de thioglycolate à la résazurine (anaérobies strictes) avec du glycérol (40% v/v) comme agent cryoprotecteur. Un volume de milieu ensemencé est mélangé à un volume de glycérol 40% (v/v). La température de conservation est de -20°C

IV - Les souches microbiennes

Bacillus cereus souche ATCC 9139 (= NCIMB 11925 = NRRL : NRS-232): 1952, R.E. Gordon, New Jersey Agri. Exper. Stat., New Brunswick, USA: strain 232 AMNH, New York, USA: strain 724 W.W. Ford (Institut Pasteur, 1994).

Escherichia coli souche ATCC 25922 (= DSM 1103 = JCM 5491 = NCIMB 12210): Pathogène du groupe 2, d'origine humaine, elle est utilisée pour le contrôle qualité des produits API (Institut Pasteur, 1994).

Enterobacter sakazakii souche CIP 103183 T (= ATCC 29544 = CCUG 14558 = DSM 4485 = JCM 1233 = LMG 5740): Pathogène du groupe 2, souche type d'origine infantile, elle provient de la gorge d'un malade (Institut Pasteur, 1994).

Les souches "sauvages" utilisées pour les challenges tests sont *Bacillus cereus* AMYP2-3, BMYP7-3, BBP5-1, BBP5-2 et BBP7-3 ; *Escherichia coli* AMC2-1 ; *Enterobacter sakazakii* AMC8-3. La conservation des souches est faite à -20°C dans du glycérol comme décrit précédemment.

Les précautions pour la manipulation des souches pathogènes de classe 2 (*Bacillus cereus* souche ATCC 9139, *Escherichia coli* souche ATCC 25922, *Enterobacter sakazakii* souche CIP 103183 T) ont nécessité l'utilisation d'un laboratoire de microbiologie P2 équipé d'une hotte à flux laminaire (PSM classe II). Tous les matériels

souillés sont, soit passés à l'eau de javel (verrerie, pipettes, lames) avant d'être autoclavés, soit autoclavés directement (matériels en plastique) puis nettoyés ou placés dans des conteneurs adaptés aux matières infectieuses pour une destruction ultérieure.

V - Les Milieux de culture

V.1. - Le bouillon cœur-cervelle

C'est un bouillon qui apporte les sources de carbones d'azote et de sels minéraux favorables au développement optimal de la bactérie. Il est utilisé pour la recherche de la staphylocoagualse après 24 heures d'incubation à 37°C. Ce milieu contient de l'infusât de cerveau et de cœur, de la peptone, du glucose, du chlorure de sodium et du Di-sodium hydrogénophosphate. 37,0 g (Becton Dickinson Réf. 211059) de bouillon déshydraté sont mélangés à 1 litre d'eau distillée jusqu'à dissolution complète. Le pH est ajusté à 7,2-7,4. Le bouillon est reparti en tubes à essai avant l'autoclavage à 121°C pendant 15 minutes.

V.2. - Le bouillon nutritif

Ce milieu liquide permet de cultiver la plupart des germes qui n'ont pas d'exigences nutritionnelles particulières (Guiraud, 1998). 8,0 g de milieu déshydraté (Difco Ref : 234000) sont ajoutés à un litre d'eau distillée jusqu'à dissolution complète. On ajuste par la suite le pH à 7,0 – 7,2 (à 25°C). Le bouillon est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes.

V.3. - Le bouillon thioglycolate à la résazurine

Ce bouillon est utilisé pour la culture et l'isolement des germes anaérobies stricts ou facultatifs ainsi que pour les bactéries micro-aérophiles. Il contient de la peptone de caséine, de l'extrait de levure, du glucose, de la cystine, du Chlorure de sodium, du thioglycolate de sodium et de l'agar-agar. L'indicateur rédox est la résazurine sodique. Le thioglycolate et la cystéine, deux composés réducteurs, provoquent une anaérobiose suffisante pour les souches anaérobies strictes exigeantes. Une élévation éventuelle de la teneur en oxygène est révélée par le virage au rouge de la résazurine qui est un indicateur coloré d'oxydo réduction (Guiraud, 1998).

Pour la préparation, 29,5 g (Biorad Réf. 64084) du milieu déshydraté sont dissous dans 1 litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,0 – 7,2. 16 mL de milieu sont répartis dans les tubes avant l'autoclavage à 121°C pendant 15 minutes.

Le milieu est inoculé au le fond du tube en prenant soin de pas introduire d'air et incubé 24 heures à 46°C.

V.4. - Le milieu pour *Bacillus* sp

C'est un milieu riche qui peut être additionné de nombreux suppléments pour le rendre sélectif vis a vis de différents groupes bactériens. Il est recommandé généralement pour les isollements et plus particulièrement pour la revivification et la conservation des souches pures de la collection Pasteur (Institut Pasteur, 1994).

10 g de Bacto Peptone (Difco Ref : 0118-17) ; 3 g de Bacto Extrait de levure (Difco Ref : 212750) 5 g de Na Cl et 20,0 g d'agar-agar (Becton, Dickinson and Company USA réf : 214010) sont ajoutés à 1 litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,0 – 7,2. L'autoclavage se fait à 121°C pendant 15 minutes. L'incubation dure 18/24h à 30°C-37°C en aérobiose.

V.5. - Le milieu de Baird-Parker (BP)

Ce milieu est utilisé pour la recherche et dénombrement de *Staphylococcus* à coagulase positive (Guiraud, 1998). Ce milieu contient une base nutritive riche (Extraits de viande, Peptones de caséine, Extraits de levure) additionnée de pyruvate de sodium, de glycolle, des accélérateurs de croissance des staphylocoques. La sélectivité du milieu est assurée par la présence du chlorure de lithium et de tellurite de potassium.

Trois caractères sont lus : la réduction du tellurite en tellure noir qui colore en noir les colonies ; la protéolyse des protéines du jaune d'œuf qui se traduit par un halo clair (transparent) entourant la colonie ; l'hydrolyse, par une lécithinase, des lécithines du jaune d'œuf qui se traduit par un liseré blanc opaque (précipité blanc des acides gras).

Sur ce milieu, les colonies de *Staph. aureus* présentent un aspect caractéristique après 24 heures d'incubation à 37°C : colonies noires, brillantes, entourées d'un halo de lyse transparent de 2 à 5 mm de diamètre à l'intérieur duquel on peut observer un halo de précipitation opaque blanc (lipoprotéinase + lécithinase + réduction du tellurite en tellure).

Il est possible d'observer sur ce milieu la croissance de microcoques qui forment des colonies circulaires brunâtres, de *Bacillus* formant des colonies irrégulières et des entérocoques caractérisés par des colonies noires et brillantes.

Pour la préparation de milieu de base déshydraté 57,0 g de BP base (Biorad Ref 64814) sont ajoutés à un litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,0 – 7,2 puis le mélange est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes. Après refroidissement à 45-50°C, on ajoute aseptiquement 25,0 mL d'une solution stérile de sulphaméthazine de sodium à 0,2% (Biorad Ref 3562682) et 50,0 mL d'une solution de jaune d'œuf au tellurite de potassium (Biorad Ref 3554205). L'incubation se fait à 35-37°C en aérobiose pendant 48 heures.

V.6. - Le milieu gélosé Columbia au sang (GS)

C'est un milieu d'isolement enrichi par la présence du sang sur lequel les Streptocoques se développent bien (Sinton *et al.*, 1993a). Il permet la lecture du caractère hémolytique. Il est aussi préconisé pour la culture des espèces lors de tests d'identification utilisant la galerie API Staph.

44,0 g de milieu déshydraté (Difco Ref 279240) sont ajoutés à 1 litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,0 – 7,2. Le milieu est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes. Après refroidissement, on ajoute stérilement 5% (v/v) de sang de mouton (Biorad Ref 56652). La durée de l'incubation à 37°C en aérobiose est de 18 à 24h.

L'hémolyse β (hémolyse totale des globules rouges) est caractérisée par une zone claire d'hémolyse totale de diamètre 3-4 mm entourant les colonies. L'hémolyse α (hémolyse partielle des globules rouges) se traduit par une zone floue et granuleuse, verdâtre de 1 à 2 mm de diamètre. Les autres colonies sont dites à hémolyse négative (Guiraud, 1998).

V.7. - Le milieu désoxycholate citrate lactose (DCL)

Encore appelé milieu de Leifson-Hynes, c'est un milieu de dénombrement des coliformes en microbiologie alimentaire. La présence de deux inhibiteurs des bactéries Gram+ à faible concentration, le désoxycholate (sels biliaires) et le citrate de sodium en fait de lui un milieu sélectif pour les entérobactéries. On y recherche la fermentation du lactose. Les colonies rouges : bactéries lactose+ sont présumées être des coliformes. Les colonies incolores sont des bactéries lactose-. Ce milieu de culture gélosé est aussi recommandé pour l'isolement des *Salmonella* et *Shigella*. Sa composition par litre est de 5 g de peptone, 5 g d'extrait de viande, 10 g de lactose, 8,5 g de citrate de sodium, 1 g de citrate de fer, 5 g de désoxycholate de sodium, 0,02 g de rouge neutre, 5,4 g de thiosulfate de sodium, 12 g d'agar-agar.

42,5 g de milieu déshydraté (ref 5107 Biomérieux) sont ajoutés à 1 litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,0-7,2. Le milieu n'est pas autoclavé mais porté à ébullition jusqu'à dissolution totale avant de le couler dans des boîtes de Pétri. Après 24 h à 37°C, Les souches lactose + forment de grosses colonies rouges, les souches lactose – des petites colonies incolores ou jaunes. L'apparition d'une coloration noire au centre des colonies indique la formation d'H₂S.

V.8. - Le milieu de Hajna-Kligler (HK)

C'est un milieu complexe, qui permet la recherche de plusieurs caractères biochimiques. Il est très utilisé dans l'identification des *Enterobacteriaceae*. Il contient du glucose, du lactose, de la peptone, un sel de fer et un indicateur de pH, le rouge de phénol. Les caractères recherchés sont l'utilisation du glucose, l'utilisation du lactose, la production H₂S, la production de gaz et la recherche de la Lysine Décarboxylase (LDC).

La base (55,0 g) (Difco Ref 286100) est additionnée à de l'eau distillée (1000,0 mL). Après ajustement du pH à 7,0 – 7,2, le mélange est réparti en tubes (8 à 10 mL) et autoclavé à 121°C pendant 15 minutes puis laisser à solidifier incliné pour avoir une pente et un culot.

Le milieu est ensemencé par piqûre profonde du culot et, dans le même geste, d'une strie sur la pente à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. Il est important de dévisser partiellement les bouchons pour permettre les échanges gazeux. Après 18 à 24 h à 37°C, le virage de l'indicateur de pH au jaune dans le culot indique une utilisation du glucose par fermentation. Sur la pente, la croissance est en aérobose. Un virage au jaune indique que l'espèce est capable d'utiliser le lactose. La production de gaz et d'H₂S sont respectivement mis en évidence par la présence de bulles et le noircissement dans le culot dû à la formation de sulfure de fer insoluble entre les ions sulfure et les ions ferreux présents dans le milieu.

V.9. - Le milieu de Mac Conkey sans cristal violet (MC)

C'est un milieu d'isolement sélectif et de différenciation destiné à la recherche des bacilles Gram négatif comme les entérobactéries dont *Salmonella* et *Shigella*. On y trouve des peptones de caséine, des peptones de viande, du lactose, du Chlorure de sodium et de l'agar-agar. La sélectivité repose sur la présence de sels biliaires, inhibiteurs des Gram+. L'indicateur coloré est le rouge neutre. Sur ce milieu peuvent se développer des entérocoques et des staphylocoques malgré la présence de sels biliaires.

Les colonies lactose-négatives sont incolores ou jaunes, les colonies lactose-positives sont rouges avec un halo trouble dû aux acides biliaires précipités par l'abaissement du pH. Salmonelles, Shigelles et les autres lactose- sont incolores, transparentes. *Escherichia coli* donnent de grandes colonies rouges avec un halo trouble. Certains *Enterobacter* et *Klebsiella* donnent de grandes colonies roses muqueuses. D'autres *Enterobacter*, staphylocoques et autres donnent de très petites colonies opaques.

Pour la préparation, 52,0 g de la base déshydratée (Biorad Ref 64154) sont ajoutés à un litre d'eau distillée. Après homogénéisation et ajustement du pH à 7,0 – 7,2, le mélange est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes. L'incubation se fait à 35°C-37°C en aérobose pendant 24h.

V.10. - Le milieu Mannitol Mobilité (MM)

Ce milieu est peu gélosé, il permet l'étude de la dégradation du mannitol, la mobilité des espèces et la recherche de la nitrate réductase. Il est composé d'hydrolysats tryptique de caséine, du mannitol, du rouge de phénol, du nitrate de potassium et de l'agar.

Le milieu est préparé en ajoutant 22,0 g de milieu déshydraté (Biorad Ref 64874) à 1 litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 8,0-8,2. Le mélange est porté à ébullition, réparti en tubes à essai de 160 mm de hauteur pour 16 mm de diamètre à raison de 8 à 10 mL par tube. Les tubes sont autoclavés à 121°C pendant 15 minutes puis laissés à refroidir verticalement pour avoir un culot solidifié.

L'ensemencement se fait par piqûre centrale à l'aide d'une pipette Pasteur fermée ou d'un fil droit. L'utilisation du mannitol conduit à l'acidification du milieu qui se traduit par le virage au jaune du rouge de phénol. Les souches mobiles diffusent à partir de la piqûre centrale dans tout le tube qui s'opacifie alors que les souches immobiles se développent uniquement au niveau de la piqûre.

V.11. - Le milieu MEVAG

C'est un Milieu pour l'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides (Biorad Ref 3555544). La composition du milieu en g/L est 25 g d'extrait de viande, 5,0 g de K Cl, 3,0 g d'agar, 0,02 g de rouge de phénol. Le pH est ajusté à 7,0-7,2. Le mélange est porté à ébullition puis le milieu est distribué dans des tubes de 160 mm de hauteur pour 16 mm de diamètre à raison de 8 mL par tube avant d'être autoclavé à 121°C pendant 15 minutes.

Dans deux tubes de milieux MEVAG stérile en surfusion à 44-47°C, sont ajoutées aseptiquement 7 gouttes d'une solution aqueuse stérile de glucose à 30% (w/v). Après agitation et refroidissement les tubes sont inoculés par piqûre centrale avec une pipette Pasteur fermée. Dans l'un des tubes, on verse aseptiquement de l'huile de paraffine afin de créer les conditions d'anaérobiose. Les tubes sont incubés à 37°C pendant 24 heures sans les fermer hermétiquement. Un métabolisme fermentatif provoque une acidification rapide qui entraîne le virage au jaune sur toute la hauteur des deux tubes. Le gaz éventuellement produit formera des bulles dans la gélose et sous la paraffine.

Pour les bactéries oxydatives, il y aura peu ou pas de culture dans le tube avec l'huile de paraffine, une acidification modérée dans le second tube (débutant en surface) et jamais de production de gaz.

Les bactéries qui n'assimilent pas le glucose ne cultivent pas dans le tube avec l'huile de paraffine. Une culture sans modification de pH (pas d'acidification) ou une alcalinisation plus ou moins forte en surface (virage au rouge violet) peut apparaître dans l'autre tube dû à l'utilisation des peptones du milieu.

V.12. - Le milieu de Mossel ou Mannitol-egg Yolk-Polymyxin (MYP)

Ce milieu est utilisé pour l'isolement sélectif de souches de *Bacillus cereus*. La sélectivité est assurée par la polymyxine qui inhibe ou retarde la croissance d'autres souches (Guiraud, 1998 ; Shinagawa, 1990). Après 18/20h d'incubation à 35-37°C en aérobiose sur ce milieu, les colonies de *Bacillus cereus* apparaissent rugueuses, sèches, roses à rouges (mannitol-) et entourées d'un halo clair d'hydrolyse des protéines du jaune d'œuf de précipité blanchâtre (produits d'hydrolyse insolubles formés par l'action de la lécithinase sur la lécithine) (Sarrias *et al.*, 2002). Les autres colonies sont jaunes

45,0 g de milieu de base déshydraté (Biorad Ref : 69604) sont mélangés à 950 mL d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,0-7,2 puis le milieu est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes. Après refroidissement à 45-50°C, on ajoute aseptiquement 10,0 mL de sulfate de polymyxine (Sigma Ref : P-4932) à 0,1% (w/v) et 100,0 mL d'émulsion de jaune d'œuf (Sigma Ref : E-7899) à 20% (v/v).

V.13. - La gélose nutritive (GN)

C'est un milieu d'isolement et de numération non-sélectif qui permet la culture des bactéries peu exigeantes. De composition simple, elle contient des peptones de caséine, de l'extrait de levure, du glucose et de l'agar-agar.

21,0 g de milieu déshydraté (Biorad Réf. 64485 & Difco Réf. 234000) sont mis en suspension dans 1 litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,0-7,2 puis le milieu est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes. L'incubation est de 24 heures à 30°C-37°C en aérobiose.

V.14. - Le milieu Plate Count Agar (PCA)

C'est un milieu non sélectif qui permet la croissance de la majorité des bactéries rencontrées dans les aliments et qui sont capables de croître entre 30°C et 37°C. 17,5 g de milieu PCA déshydraté (Fluka Réf : 70152) sont ajoutés à un litre d'eau distillée. Après ajustement du pH à 7,0 – 7,2, le mélange est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes. L'incubation se fait à 30°C-37°C en aérobiose pendant 24h.

V.15. - Le milieu Tryptone Sulfite Cyclosérine (TSC)

C'est un milieu utilisé pour le dénombrement des bactéries anaérobies sulfito-réductrices (spores de *Clostridium* sulfito-réducteurs et *Clostridium perfringens*) dans les produits alimentaires.

La composition est constituée d'extrait de viande de bœuf (5g), de tryptose (15g), de peptone de farine de soja (5g), d'extrait de levure (5g), de disulfite de sodium (1g), de citrate de fer ammoniacal (1g) et de gélose (19g). L'agent sélectif est la D-cyclosérine (0,2g). Le tryptose, la peptone de farine de soja et l'extrait de levure assurent aux clostridies les meilleures possibilités de développement. Le citrate de fer ammoniacal et le sulfite de sodium permettent de mettre en évidence les colonies productrices d'H₂S. La D-cyclosérine donne au milieu une meilleure sélectivité vis-à-vis de *Clostridium perfringens* (comparativement aux antibiotiques polymyxines et kanamycines), elle diminue la taille des halos noirs diffus et gênants autour des colonies de *Clostridium perfringens* dans le même temps.

La température d'incubation permet de sélectionner les différents types bactériens. Ainsi, les anaérobies sulfito-réducteurs sont recherchés à 37°C, quant à *Clostridium perfringens* l'incubation est réalisée à 46°C. Les bactéries sulfito-réductrices produisent des ions sulfures à partir du sulfite de sodium du milieu. Ces ions sulfures se combinent aux ions ferriques (citrate de fer) du milieu pour former un précipité noir insoluble.

Le milieu est préparé en mélangeant 42,0 g de milieu de base déshydraté (Biorad Réf. 69644) à 1 litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,0 – 7,2 puis le milieu est autoclavé à 121°C pendant 15 minutes. Après refroidissement à 45-50°C, on ajoute

aseptiquement 10,0 mL d'une solution stérile de D-cyclosérine (Fluka Réf. 30020) à 40 mg/mL. L'incubation est de 24h à 37 ou 46°C en jarres anaérobies en présence de kit générateur d'anaérobiose GENbox (Biomerieux France, ref 96 124).

V.16. - La gélose Viande Foie (VF)

Ce milieu est principalement utilisé en tube profond pour déterminer le type respiratoire. En plus d'extraits de Viande et de foie, ce milieu contient du glucose, de l'amidon, du sulfite de sodium, du citrate de fer ammoniacal et de la gélose. La base nutritive réalisée à partir de viande et de tissus de foie maintient un degré adéquat d'anaérobiose dans le milieu de culture et donc fournit un supplément riche de nutriments. Les sulfites présents dans le milieu de culture sont réduits en H₂S par certains micro-organismes anaérobies (comme certaines espèces de *Clostridium*), ceci est mis en évidence par l'apparition d'halo noir dû à la présence du sulfure de fer.

46,5 g de milieu déshydraté (Biorad Réf. 69654) sont ajoutés à 1 litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,0-7,2. Le milieu est porté à ébullition puis le milieu en surfusion est distribué dans des tubes bouchés à vis de 120 mm de hauteur environ pour un diamètre de 10 mm. Les tubes sont autoclavés à 121°C pendant 15 minutes. Avant utilisation les tubes de milieu sont portés à ébullition au bain-marie bouillant pendant environ 20 minutes pour chasser l'oxygène du milieu (régénération) puis refroidis pour laisser le milieu en surfusion. L'inoculation se fait à l'aide d'une pipette Pasteur stérile scellée de bas en haut en décrivant de larges spirales. Après refroidissement rapide à l'eau froide, les tubes sont incubés à 37°C pendant 18 à 24h.

Dans ces conditions seules, les souches aérobies strictes se développent en surface. Les souches aéro-anaérobies facultatives se développent dans tout le tube et les souches anaérobies strictes uniquement dans le tiers inférieur du tube. Les souches micro-aérophiles forment des colonies dans une zone de faible hauteur située juste sous la surface du milieu.

VI - Les diluants

VI.1. - L'eau peptonée tamponnée

L'eau peptonée permet la croissance des bactéries sans exigences nutritionnelles particulières. La composition est : peptone exempt d'indole 15 g/l, NaCl 5 g/l.

Le milieu est préparé en ajoutant 15,0 g de milieu déshydraté (Biorad Réf. : 64334 & Diagnostic Pasteur Ref 64334) à 1 litre d'eau distillée. Le pH est ajusté à 7,0–7,2. L'eau peptonée est stérilisée à 121°C pendant 15 minutes.

VI.2. - L'eau physiologique

C'est une solution isotonique à 8.5 ‰ (w/v) de Na Cl à pH de 7,0–7,2 stérilisée à 121°C pendant 15 minutes,

VII - Les analyses microbiologiques

VII.I - Les isolements

Ils sont réalisés par ensemencement en stries sur des milieux solides en boîtes de Pétri en présence de gélose nutritive (ou milieu TSC pour les souches anaérobies). L'incubation est faite à 35-37°C pour les germes mésophiles (ou 46°C pour les germes anaérobies thermophiles) durant 24 heures.

VII.2. - Les dénombrements

Dix millilitres, ou 10 g (pour les granules) d'échantillon sont prélevés aseptiquement sous une hotte à flux laminaire et mis en suspension dans 90 mL d'eau physiologique (ou 90 mL d'eau peptonée tamponnée pour les staphylocoques) dans des sacs Stomacher. Le tout est homogénéisé 60 secondes avec un broyeur Homogénéisateur de marque Stomacher. Dans ces conditions, 1 mL de suspension équivaut à 0,1 g ou 0,1 ml d'échantillon.

Pour chaque prise d'essai, deux boîtes de Pétri sont ensemencées. Les résultats sont les moyennes. Quatre groupes de bactéries ont retenu notre attention, à savoir les entérobactéries sur milieu MC, les staphylocoques sur milieu BP, les *Bacillus* sur milieu MYP et les clostridies sur milieu TSC bactéries.

Parallèlement, l'analyse de la matière sèche est aussi réalisée sur chacun des échantillons. Pour ce faire 5g (ou 5mL dans lorsque l'échantillon est liquide) sont mis à l'étuve 105°C pendant 24 heures. La différence de poids entre l'échantillon avant et après étuvage permet d'obtenir le taux en matière sèche.

A partir des suspensions des dilutions décimales (avec les mêmes diluants) sont réalisées et utilisées pour inoculer les milieux soit 1 mL dans la masse (PCA) ou 0,1 mL en surface (BP, MYP, TSC etc...)

VIII - L'identification des espèces bactériennes

L'identification des espèces microbiennes isolées lors des étapes de fabrication des bouillies fermentées respiratoires repose sur des caractéristiques microscopiques (Gram), sur des caractéristiques physiologiques et biochimiques comme la recherche de la catalase et de l'oxydase, le type respiratoire sur milieu VF, la voie d'assimilation des glucides sur milieu MEVAG, le métabolisme fermentaire sur les milieux Hajna-Kliger et mannitol mobilité, les galeries API et la recherche de la staphylocoagulase (Tableau 6).

Tableau 6 : Récapitulatif des tests d'orientation réalisés sur les isolats

Forme et association	Coloration de Gram	Catalase	Oxydase	Mobilité sur Mannitol-Mobilité	Métabolisme fermentaire sur MEVAG glucosé	Type respiratoire sur Viande-Foie	Aspect des colonies sur gélose nutritive	Orientation
Coques en paire	Gram-		Oxydase variable	Mobilité -	glucose+	AS	Développement difficile sur gélose nutritive	Neisseria
Coques en amas	Gram +	Catalase +	Oxydase -	Mobilité -	Fermentation +	AAF	colonies lisses, rondes, bombées, brillantes, opaques, habituellement en jaune doré (<i> aureus</i>)	Staphylocoques.
Coques en amas	Gram +	Catalase +	Oxydase +	Mobilité -	Fermentation -	AS	Développement variable sur gélose nutritive	Micrococcus Pediococcus
Coques en tétrades	Gram +	Catalase -		Mobilité -		ANA	Lisses, fréquemment pigmentées	Sarcina
Coques en chaîne, en tétrades	Gram +	Catalase-	Oxydase -	Mobilité -	Fermentation + (avec gaz)	AAF	Petites colonies	Leuconostoc
Coques en chaîne, en tétrades	Gram +	Catalase-	Oxydase -	Mobilité-	Fermentation + (sans gaz) (le genre <i>Streptococcus</i> n'a pas de métabolisme aérobie)	AAF	Petites colonies	Streptocoques
Bacilles de grande taille en chaînes sporulés (centrale ou paracentrale)	Gram+ (Gram-pour les colonies âgées)	Catalase +	Oxydase variable	Mobilité variable	Fermentation +	AAF	Colonies aplaties, à bords irréguliers, à surface rugueuse.	Bacillus
Bacilles sporulés en chaînettes (centrale ou subterminale)	Gram+ (Gram-pour les colonies âgées)	Catalase -		Mobilité variable	Fermentation +	ANA	En anaérobiose, croissance variable sur gélose nutritive	Clostridium
Bacilles et coccobacilles asporulés	Gram+	Catalase +	Oxydase -	Mobilité -	Fermentation variable	AS, MA, AAF	croissance variable sur gélose nutritive	Actinobactéries (<i>Actinomyces</i> , <i>Corynebacterium</i> ; <i>Brevibacterium</i> ; <i>Propionibacterium</i> ; <i>Streptomyces</i> ; <i>Mycobacterium</i> ; <i>Listeria</i>)
Bacilles et coccobacilles asporulés	Gram+	Catalase -	Oxydase -	Mobilité -	Fermentation +	MA, AAF	Croissance difficile sur gélose nutritive	Lactobacillus Bifidobacterium

Bacilles et coccobacilles	Gram-	Catalase +	Oxydase+	Mobilité+	Oxydatif	AS	Pigmentées	Pseudomonas
Bacilles et coccobacilles	Gram-	Catalase +	Oxydase+	Mobilité+	Fermentation + ou non	AS, MA, AAF	Petites colonies plates Lisses, brillantes, translucides	Vibrions et genres voisins (<i>Aeromonas</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Plesiomonas</i> , <i>Photobacterium</i>).
Bacilles et coccobacilles	Gram-	Catalase variable	Oxydase+	Mobilité +	Glucose -	MA	Croissance difficile sur gélose nutritive	Campylobacter (incapable d'utiliser les sucres par oxydation ou par fermentation)
Bacilles et coccobacilles	Gram-	Catalase +	Oxydase+	Mobilité-		AS	Croissance très lente.	Brucella (qq espèces sont oxydase-) et genres voisins (<i>Legionella</i>)
Bacilles et coccobacilles	Gram-	Catalase +	Oxydase-		Oxydatif	AS	Pigmentées (<i>Xanthomonas</i>); ou non	Xanthomonas - pigment jaune; Acinetobacter - pas de pigment
Bacilles et coccobacilles	Gram-	Catalase +	Oxydase-		Fermentation +	ANA		Zymomonas
Bacilles et coccobacilles	Gram-	Catalase variable	Oxydase-	Mobilité +	Fermentation+	AAF	Apigmentées (sauf <i>Serratia</i>), lisses ou rugueuses, 1 à 3 mm de diamètre	Entérobactéries : <i>Citrobacter</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Serratia</i> , <i>Escherichia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Proteus</i>
Bacilles et coccobacilles	Gram-	Catalase variable	Oxydase-	Mobilité -	Fermentation+	AAF	Apigmentées lisses ou rugueuses, 1 à 3 mm de diamètre	Entérobactéries : <i>Shigella</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Klebsiella</i>

AS : aérobie stricte ; AAF : aérobie-anaérobie facultatif ; MA : micro-aérophile ; ANA : anaérobie strict

VIII.1. - La coloration de Gram

La coloration a été réalisée en utilisant le kit Color Gram2 (réf 55542, Biomérieux France).

VIII.2. - La recherche de la catalase

Elle est réalisée sur une lame propre et sèche sur laquelle est déposée une goutte d'eau oxygénée à 10 volumes dans laquelle est mise en suspension une colonie isolée à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. L'apparition immédiate de bulles d'oxygène indique la présence de la catalase.

VIII.3. - Le test oxydase

Il permet la mise en évidence de la présence de cytochrome oxydase, un enzyme qui réduit l'oxygène à la fin de la chaîne de cytochromes de transfert des électrons. En présence d'une activité cytochrome oxydase, le réactif N-diméthyl-paraphénylène-diamine incolore est oxydé pour donner un composé de couleur rose foncé. Un disque de cellulose stérile est déposé sur une lame de microscope. Le disque est imbibé d'une goutte de réactif (Oxydase Reagent ; Ref 55635, Biomérieux, France) avec une pipette Pasteur. A l'aide de la pointe d'une pipette Pasteur stérile, une colonie isolée est prélevée sur gélose nutritive et la pointe de la pipette est mise en contact avec le disque imprégné. Le test est positif lorsqu'une coloration rose foncée se développe au point de contact.

VIII.4. - La recherche de la staphylocoagulase

Cette recherche est souhaitée dans le cadre de la présomption de *Staphylococcus aureus* pathogène. Cette enzyme, présente chez ces espèces, coagule le fibrinogène dans le plasma de lapin. L'espèce à tester est préalablement cultivée dans du bouillon cœur-cervelle à 37°C pendant 18 à 24 heures.

Le plasma de lapin lyophilisé (Staph-ase Réf 55 181 Biomérieux France) est reconstitué avec de l'eau distillé stérile. Dans un tube à hémolyse stérile, on introduit 0,5 mL de plasma + 0,5 mL d'une culture de 18 h en bouillon cœur-cervelle de l'espèce à étudier.

Après homogénéisation, les tubes sont placés à l'étuve à 37°C pendant 1 à 3 heures. En cas de réaction négative, l'incubation est prolongée jusqu'à 24 heures. La réaction positive est observée par l'apparition d'un caillot visible, en comparaison avec le témoin sans ajout de plasma, lors de l'inclinaison douce du tube afin d'éviter la rupture d'un caillot.

VIII.5. - La recherche de l'entérotoxine de *B. cereus* (Oxoid)

La recherche repose sur une agglutination passive reverse de particules de latex (Guiraud, 1998) par l'utilisation du Kit BCET-RPLA Toxin Detection (Réf. TD 0950A ; Oxoid, France). Ce coffret permet la recherche directe de l'entérotoxine diarrhéigène par agglutination passive reverse de particules de latex par microtitration. Le test BCET-RPLA permet de rechercher cette entérotoxine dans différents aliments et donne un résultat semiquantitatif. On peut aussi rechercher sa production sur des souches de *Bacillus cereus*. Des particules de latex sont sensibilisées par un antisérum de lapin anti-entérotoxine de *Bacillus cereus*. Elles agglutineront en présence d'entérotoxine de *Bacillus cereus*.

Production de l'entérotoxine en bouillon de culture :

Le germe isolé est ensemencé dans un bouillon cœur-cerveille et incubé 18 heures à 37°C sous agitation (250 cycles/minute). Ensuite, l'ensemble est refroidi 30 minutes à 4°C puis centrifugé 20 minutes à 3 000 tours/minute. Le surnageant est utilisé pour la recherche de toxine

Contrôle :

Le contrôle entérotoxine (TD0953) doit être utilisé comme un échantillon. Il agglutinera le latex sensibilisé. Son utilisation permet de contrôler le réactif latex et constitue un témoin pour les aspects positifs.

Mode opératoire :

Il est impératif d'agiter soigneusement les réactifs au latex avant leur utilisation pour avoir une suspension homogène. Le contrôle entérotoxine est reconstitué avec 0,5 ml de diluant (Oxoid ref :TD954) suivi d'un mélange jusqu'à dissolution complète.

Chaque échantillon nécessite l'utilisation de 2 rangées de 8 puits. 25 µl de diluant (Oxoid ref :TD0954) sont repartis (à l'exception du premier puits) de chaque rangée. On ajoute ensuite 25 µl d'échantillon aux 2 premiers puits des 2 rangées. Avec une micropipette, reprendre 25 µl dans le deuxième puits de chaque rangée et effectuer des dilutions au 1/2 successives dans chaque rangée jusqu'au septième puits, le dernier ne contenant que le diluant. 25 µl de réactif latex (TD0951) sont ajoutés à chaque puits de la première rangée. Dans la deuxième rangée, on ajoute 25 µl de contrôle latex (TD0952) à chaque puits. Le contenu de chaque puits est mélangé par rotation à la main en évitant de faire déborder. On recouvre la plaque d'un couvercle pour éviter l'évaporation. Le tout est incubé 20 à 24 heures à l'abri de toute vibration. La lecture est facilitée par un papier noir placé sous la plaque avant l'incubation. L'examen des puits de chaque rangée est réalisé sur un fond noir. Il est important que les tubes à centrifuger, plaques de microtitration, couvercles et embouts de micropipette, doivent être stérilisés 15 minutes à 121°C à l'autoclave avant utilisation et désinfectés avant élimination.

Lecture et interprétation des résultats :

Le degré d'agglutination s'obtient par comparaison avec les figures fournies par le fabricant. Aucune agglutination ne doit apparaître dans la rangée de puits contenant le contrôle latex. Dans certains cas, une agglutination non spécifique peut se produire. Considérer alors la réaction comme positive si l'agglutination dans la rangée de puits contenant le réactif au latex est à une dilution plus haute que dans celle contenant le contrôle latex. Le dernier puits de chaque rangée doit être négatif. Si un aspect positif apparaît, considérer la réaction comme non valable.

VIII.6. - Les galeries API

Galerie API 50 CHB/E (Réf. 50 300 & 50 430 ; Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) de 50 tests biochimiques permettant l'étude du métabolisme glucidique des microorganismes. La fermentation d'un substrat osidique se traduit par une acidification révélée par le virage d'un indicateur de pH sauf pour le test n°25 concernant l'esculine pour lequel on observe un virage au noir dû à la réaction de l'esculétine produit de l'hydrolyse de l'esculine qui forme un précipité noir avec les ions ferriques présents dans le milieu. Le premier tube, sans substrat, sert de témoin négatif. Les microorganismes à tester sont mis en suspension dans le milieu API 50 CHB/E

Medium puis inoculés dans chaque tube de la galerie. Après incubation à 37°C pendant 24 à 48 h heures, les résultats obtenus sont traités par le logiciel d'identification API LAB plus (Biomérieux, France)

Galerie API 20E (Réf. 20 100, Biomérieux, Marcy l'Etoile, France,) pour l'identification des *Enterobacteriaceae* et autres bacilles à Gram négatif non fastidieux, comprenant 21 tests biochimiques. Les microtubes sont inoculés avec une suspension dans de l'eau physiologique d'une colonie isolée qui reconstitue les tests. Les réactions produites pendant la période d'incubation (37°C pendant 24 heures) se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par l'addition de réactifs. Le 21^{ème} test concerne la recherche de l'oxydase. L'identification est obtenue à l'aide du logiciel API LAB plus.

Galerie API 20NE (Réf. 20 050, Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) comporte des tests spécifiques pour la caractérisation des bacilles Gram négatifs non entérobactéries. L'essai a été réalisé selon les instructions du fabricant (Biomérieux). Les assimilations de substrat ont été lues après 24 et 48 H. L'interprétation des résultats a été faite après 24-48 h en utilisant du logiciel API LAB plus.

Galerie API Staph (Réf. 20 500, Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) pour l'identification des espèces de staphylocoques et de microcoques comprenant 21 tests biochimiques pour l'identification des staphylocoques. Les suspensions sont réalisées dans le diluant API Staph Medium à partir de colonies pures prélevées sur milieu Columbia au sang de mouton. L'incubation est de 24 heures à 37°C. Les réactions positives se traduisent par des virages colorés spontanés ou révélés après l'addition de réactifs. L'identification est obtenue à l'aide du logiciel API LAB Plus.

Galerie API 20 A (Réf. 20 300, Biomérieux France) permet l'identification biochimique des bactéries anaérobies strictes. Elle comporte 20 tests qui sont inoculés avec une suspension bactérienne réalisée dans le diluant API 20 A Medium. L'incubation est de 24 à 48h à 37°C en anaérobiose dans une jarre anaérobie équipée d'un kit générateur d'anaérobiose. L'identification est obtenue à l'aide du logiciel d'identification API LAB Plus.

IX - Les tests de croissance

Les "Tests de croissance" (ou challenge-tests) ont été réalisés conformément aux recommandations de l'ADRIA (Association pour le Développement de la Recherche Agro-Alimentaires) (Notermans *et al.*, 1993), cela consiste à inoculer artificiellement un produit alimentaire avec des germes pouvant présenter un danger pour la santé des consommateurs et à faire subir au produit les traitements habituels de fabrication, de cuisson et de conservation (Notermans *et al.*, 1993 ; Notermans and in't Veld, 1994).

E. coli a été retenue est parce que cette bactérie, hôte du tube digestif des animaux et de l'Homme, reflète assez bien l'état sanitaire des bouillies consommées (Motarjemi *et al.*, 1993). Par contre *Ent. sakazakii*, appartenant aussi à la famille des entérobactéries est de plus en plus reconnu comme un germe pathogène pour les enfants (Gurtler *et al.*, 2005). *B. cereus* est connu comme contaminant naturel des produits à base de céréales et est impliqué dans les toxi-infections alimentaires (te Giffel *et al.*, 1996). Des souches de collections et des souches sauvages isolées au cours de cette thèse ont été utilisées pour la réalisation des challenges-tests.

IX.1. - La préparation des inocula

Les souches de collection (ATCC 9139, 25922, CIP 103183T) lyophilisées sont réhydratées et revivifiées dans 2 mL d'eau peptonée tamponnée stérile à la température ambiante pendant 5 minutes. A partir de cette suspension, 10 mL de bouillon nutritif sont ensemencés par 1 ml et un isolement est réalisé sur le milieu Columbia ou sur le milieu pour *Bacillus* selon les recommandations de l'Institut Pasteur (1994). Après 24 heures à 30°C les colonies sont à nouveau isolées sur milieu PCA pendant 24 heures à 37°C. Les souches isolées des produits des ateliers de fabrication, sont repiquées deux fois sur milieu PCA, 24 heures à 37°C.

A partir de colonies présentes sur les milieux PCA, des tubes de bouillon nutritifs sont inoculés et incubés 24 heures à 37°C. Le niveau de population de la culture est vérifié par la mesure de l'absorbance à 550 nm (Multon Roy, Spectronic 1201). Les cultures sont distribuées dans des tubes Eppendorff de 1 ml qui sont centrifugés à 13000tr/mn ("Biofuge Pico" HERAEUS instruments) pendant 20 minutes à la température ambiante. Le culot est repris à l'aide de 0,5mL de surnageant. Les suspensions ainsi réalisées sont utilisées seules ou en mélanges.

IX.2. - Le suivi des populations microbiennes

Chaque heure pendant les six heures (voire 24 h pour certaines souches Gram négatif) qui suivent l'inoculation, 1 mL est prélevé puis dilué. Les dilutions décimales successives sont réalisées dans de l'eau physiologique stérile et homogénéisées à l'aide d'un vortex. On ensemence en surface (0,1mL) deux boîtes de Pétri contenant le milieu MYP pour le dénombrement de *Bacillus cereus*, et le milieu DCL pour *Escherichia coli* et *Enterobacter sakazakii* (International Food Safety Authorities Network, 2005).

Pour les spores de *Bacillus cereus*, les échantillons sont placés dans un bain marie à 80°C pendant 10 min puis l'échantillon est refroidi et laissé à incuber à 30°C pendant 72h. Le dénombrement est réalisé sur le milieu MYP.

IX.3. - L'utilisation de la nisine

La solution de nisine (Fluka BioChemika, réf 72535) à 0,1mg/mL est réalisée dans le surnageant retiré après la fermentation de la pâte qui est chauffé à 95°C pendant 10 minutes dans un bain marie agité puis refroidi. La solution obtenue est filtrée avec un filtre millipore (\varnothing 0,45 μ m) (Millex HA, réf. SLHA033SB) stérile puis stockée à 4°C. La concentration finale en nisine dans les essais est de 0, 01 mg/mL, soit 1 ml à 0,1mg/mL pour 10 ml de bouillie. La nisine est toujours ajoutée aux bouillies après l'inoculation des souches bactériennes.

X - Les méthodes de biologies moléculaires

X.1. - L'extraction de l'ADN bactérien total d'un échantillon

2 g d'échantillon sont mélangés à 2 mL d'eau peptonée tamponnée stérile. Une homogénéisation d'une minute environ est réalisée avec un vortex à la vitesse maximale.

Le mélange est réparti en microtubes Eppendorf de 2 mL, puis centrifugé à 13000 g pendant 10 min à la température ambiante. Les culots sont remis en suspension dans 100 μ L de tampon Tris HCl-EDTA à pH 8 (Tris-HCl 10 mM, réf. Promega H5123 et de EDTA 1 mM (réf. Promega V4231). Le tampon est stérilisé à 121°C pendant 15 minutes avant utilisation.

100 μ L de lysozyme à 25 mg/mL (Eurobio Gexlysoo-6Z, France) et 50 μ L de protéinase K à 20 mg/mL (Eurobio Gexproo-6U, France) sont ajoutés aux culots de la centrifugation précédente. Le mélange est incubé 20 min à 42°C au bain marie (Salvis AG 333162 Bioblock, France).

On ajoute 50 μ L de Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) à 20% (w/v) au culot qui est incubé à 42°C pendant 15 min. 400 μ L de Mixed Alkyl Trimethyl Ammonium Bromide (MATAB, ref : Sigma M 7635) à 2% (w/v) dans une solution de NaCl (3M) (ref : Riedel-de Haën 31434) est ajouté dans le microtube puis incubé à 65°C pendant 10 min (Salvis AG 333162 Bioblock, France).

Un volume (700 μ L) d'un mélange Phénol (ref : Fluka bioChemika 71725)/Chloroforme (ref : Prolabo UN 1888)/Alcool Isoamylique (ref : Panreac 121079-1211) 25 :24 :1 (v/v/v) est ajouté à un volume (~ 700 μ L) de l'hydrolysats contenu dans le tube Eppendorf. Ce mélange est à 13000 g pendant 10 min. 600 μ L du surnageant (contenant l'ADN) est ajouté à 600 μ L de Chloroforme/Alcool Isoamylique 24 :1 (v/v). Après mélange au vortex, l'ensemble est centrifugé à 13000 g/10 min (Biofugepico Heraeus, Germany).

500 μ L de surnageant mélangés à 30 μ L d'acétate de sodium (ref : Panreac 1311633.1211) 3M (pH 5) sont ajoutés à 500 μ L d'isopropanol conservé au moins 30 min à -20°C.

Une centrifugation de l'ensemble à 13000 g pendant 10 min permet de précipiter l'ADN. Le culot est lavé avec 500 μ L (1 volume) d'éthanol à 70%, créant l'apparition d'une pelote après centrifugation à 13000 g pendant 5 min. Le culot est séché à température ambiante puis repris par 50 μ L de Tampon TE [Tris-EDTA : 10 mM Tris-HCl (réf. Promega H5123) pH 8,0 1,0 mM EDTA pH 8,0 (réf. Promega V4231)]. L'ADN total extrait est conservé à -20°C.

X.2. - L'extraction de l'ADN de bactéries isolées

L'extraction est effectuée sur une culture jeune dans du bouillon nutritif après 24 heures d'incubation. 2 mL de culture sont centrifugés à 13000 g pendant 10 min. Le culot est repris dans 100 µL de tampon TE. Après la remise en suspension complète du culot, Celui-ci est traité comme le broyat d'un échantillon (cf extraction ADN total).

X.3. - La caractérisation des espèces de *Bacillus cereus* par PCR

Les réactions d'amplification sont effectuées dans un Thermo cycler PCR (PTC-100 Peltier Thermal Cycler, MJ Research, Inc., Waltham, MA, USA)

X.3.1. - L'amplification du gène gyrA-gyrB des souches de Bacillus

Les deux *primers* utilisés sont BCFW1 et BCRW1 (5' gtt tct ggt gtt tta cat gg 3' et 5' caa cgt atg att taa ttc cac c 3') (Manzano *et al*, 2003a).

La composition du mélange réactionnel de PCR est la suivante (Volume total 30 µL) : 2 µL d'extrait d'ADN de l'espèce étudiée, 6µL Tris-HCl 10 mM (réf. Promega H5123), 6 µL KCl 50 mM (réf. 47142200, Farmitalia Carlo Erba, Reuil Malmaison, France), 0,4µL DNTPs 10 mM (Eppendorf mix 9908), 3 µL de MgCl₂ 25 mM (Promega A 3513, France), 1 µL de Primer BCFW1, 1 µL de Primer BCRW1, 0,25 µL de Taq Polymerase 5 U/µL (Eppendorf U 102861 H), 30 µL qsp d'eau extra pure (Eppendorf 0032006 205, Hambourg, Germany).

Le programme des cycles est le suivant : 1 cycle de 95°C/5 min, 35 cycles de 95°C/1min, 1 cycle de 60°C/1min, 72°C/1min, 1 cycle de 72°C/7min.

X.3.2. - L'amplification de l'ADN ribosomal 16S (16S ADN_r) des souches de B. cereus

Primers : SS-Bc-200-a-S-18 (F) et SS-Bc-470-a-A-18 (R) (5' tcg aaa ttg aaa ggc ggc 3' et 5' ggt gcc agc tta ttc aac 3') (Hansen *et al.*, 2001).

Composition du mélange réactionnel de PCR, volume de 26 µL : 1 µL de ADN, 2,6 µL de MgCl₂ 25 mM, 2,6 µL de Tampon 10X (Eppendorf U 102854 H) , 0,34 µL de DNTPS 10 mM, 1 µL de Primer F, 1 µL de Primer R, 0,086 µL de Taq Polymerase 5 U/µL, 26 µL qsp d'eau extra pure

Programme des cycles : 1 cycle de 94°C/15 sec, 1 cycle de 63°C/45 sec, 30 cycles de 72°C/2 min

X.3.3. – L'amplification du gène de l'hémolysine de B. cereus

Primers : BC1 et BC2 (5' cgt tag cga atc gta cgt atc 3' et 5' tac tgc tcc agc cac att ac 3') (Fykse *et al.*, 2003).

Composition du mélange réactionnel de PCR, volume de 20 µL : 1 µL de ADN, 0,3 µL de MgCl₂ 3,5 mM, 2 µL de Tampon 10X, 0,3 µL de DNTPS 10 mM, 1 µL de Primer BC1, 1 µL de Primer BC2, 0,07 µL de Taq Polymerase 5 U/µL, 20 µL qsp d'eau extra pure.

Programme des cycles : 1 cycle de 95°C/3 min, 35 cycles de 95°C/10 sec, 1 cycle de 60°C/2 sec, 72°C/15 sec.

X.3.4. – L'amplification du gène impliquée dans la synthèse du peptide non-ribosomique impliqué dans la synthèse de la cereulide

Primers : BEF et BER (5' act tag atg atg caa gac tg 3' et 5' ttc ata gga ttg acg aat ttt 3') (Toh *et al.*, 2004).

Composition du mélange réactionnel de PCR, volume de 30 µL : 2 µL de ADN, 3 µL de MgCl₂ 25 mM, 3 µL de Tampon 10X, 0,4 µL de DNTPS 10 mM, 1 µL de Primer BEF, 1 µL de Primer BER, 0,1 µL de Taq Polymerase 5 U/µL, 30 µL qsp d'eau extra pure.

Programme des cycles : 1 cycle de 95°C/2 min, 30 cycles de 95°C/10 sec, 1 cycle de 50°C/20 sec, 72°C/80 sec, 1 cycle de 72°C/7min.

X.4. – La PCR pour la DGGE

Pour la PCR, la région polymorphe V3 de l'ADNr 16S (Ovreas *et al.*, 1997) a été choisie. Les amorces utilisées sont (Díez *et al.*, 2001 ; Ovreas *et al.*, 1997) : GC338F (Sigma-Genosys): 5' CGC CCG CCG GGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG GAC TCC TAC GGG AGG CAG CAG 3' et 518R (Sigma-Genosys): 5' ATT ACC GCG GCT GCT GG 3'.

La programmation des cycles est celle définie initialement par Ampe *et al* (1999) et améliorée par Díez *et al* (2001). Elle a consisté en l'amélioration de la spécificité de l'amplification et à la diminution des amplifications non spécifiques par la réalisation d'une "touchdown PCR" (Ampe *et al.*, 1999; Díez *et al.*, 2001). Lors du premier cycle d'amplification, la température d'hybridation est supérieure de 10°C (65°C) à la température d'hybridation des amorces (55°C). Une diminution de 0,5°C par cycle est effectuée au cours de chaque cycle jusqu'à atteindre les 55°C. La réaction est suivie par 10 cycles supplémentaires avant la dernière extension (Tableau 7).

Tableau 7 : Les conditions de PCR pour la DGGE

Nombres de cycles	Température (°C)	Durée (min)
1	94	5
20	94	1
1	65*	1
1	72	3
10	94	1
1	55	1
1	72	3
1	72	10

Tableau 8 : Réactifs et concentrations finales dans le mix

Réactifs	Concentration finale dans le Mélange
ADN en suspension	5µL (ou 2µL si souche bactérienne)
Amorces 1µM(Sigma-Genosys)	0,2µM/amorce
dNTPs 10mM (Eppendorf mix 9908)	0,2mM
MgCl ₂ 25mM (Promega A 3513 Frce)	1,5mM
Tampon Taq 10X (Eppendorf U 102854 H)	1X
Taq polymérase 5U/µL (Eppendorf U 102861 H)	0,05 U/µL
QSP 50µL d'eau ultra pure filtrée (Eppendorf 0032006.205)	

La vérification des produits PCR est réalisée sur gel d'agarose (Eurobio GEPAGA 07-66) à 2% dans du tampon TAE (Tris-Acétate-EDTA) 1X, préparé par dilution du tampon Tris-Acétate-EDTA (TAE) 50X à pH 8,3 (réf. Eppendorf 0032006604) dans de l'eau distillée.

On dépose dans chaque puits un mélange (Tableau 8) comprenant 8 µL de produit de PCR et 2 µL de bleu de Bromophénol.

La composition de la solution de bleu de Bromophénol est la suivante :

Tris pH 8,0 1M	25 mL, pour une concentration finale de 100 mM
EDTA 0,5M	50 mL, pour une concentration finale de 100 mM
Bleu de Bromophénol	0,625 g (Sigma X 4126)
Xylène cyanol	0,625 g (Sigma B 6896)
Saccharose	125 g
Eau	250 mL qsp

La migration dure 40 min à 100 volts, dans du tampon TAE 1X. Le marqueur de poids moléculaire utilisé est de 100 pb (Promega G 2101 Frce). La taille attendue des produits PCR est située entre 230 à 250 pb. Les bandes sont révélées après coloration dans un bain de BET (Bromure d'éthidium) (Promega H 5041 Frce) à 50 µg/mL pendant 20 min (Ampe *et al.*, 1999) suivi d'un rinçage à l'eau distillée sur un transilluminateur UV à 318 nm.

XI - L'électrophorèse en gel d'acrylamide en gradient dénaturant (DGGE)

XI.1. - La préparation du gel d'acrylamide

Deux solutions d'acrylamide à 30% et à 60% en agents dénaturants sont préparées (Tableau 9). Ces deux solutions sont conservées à 4°C et sorties qu'au moment de leur utilisation

Tableau 9 : Composition des solutions dénaturantes à 30% et 60% pour la DGGE.

" Basse concentration "		"Haute concentration"	
8% Acrylamide/ bisacrylamide 30% Dénaturant		8% Acrylamide/ bisacrylamide 60% Dénaturant	
40%Acrylamide/bisacrylamide	20 mL	40%Acrylamide/bisacrylamide	20 mL
TAE 50X	2 mL	TAE 50X	2 mL
Formamide	12 mL	Formamide	24 mL
Urée	12,6 g	Urée	25,2 g
Eau qsp	100 mL	Eau qsp	100 mL

Les mélanges sont réalisés dans deux tubes de 50 mL. A 16 mL de chacune de ces solution sont ajoutées 50 µL de Persulfate d'ammonium à 10% v/v (Promega V3131) et 50 µL de Temed (Promega V3161). Après mélange, le contenu des deux tubes est versé rapidement dans chacun des deux compartiments du préparateur de gradient (Bio-Rad Model 485) qui, *via* une pompe péristaltique (Percom-I, Watson-Marlon) réglée sur 20 tr/min, coule le gel entre deux plaques de verre de 20 cm sur 20 cm

espacées par un peigne de 0,75 mm. Dans ces conditions la durée de polymérisation du gel est au minimum d'une heure.

XI.2. - L'électrophorèse

Elle est réalisée dans une cuve d'électrophorèse (Bio-Rad DCODE System) remplie de tampon TAE 1X (Tris Acétate EDTA à pH 8,3) jusqu'au niveau maximum. La température du tampon est portée à 60°C avant d'y placer le gel polymérisé (sans le peigne). Une attente supplémentaire est nécessaire pour que la température se stabilise à 60°C avant de déposer les échantillons de produits de PCR (Ampe *et al.*, 1999; Díez *et al.*, 2001). Dans chacun des puits rincé au tampon TAE 1X, il est mis à la micropipette 20 µL d'échantillon PCR mélangés à 5 µL de bleu de Bromophénol. Un puits est réservé à l'ADN bactérien de la souche étudiée et un autre au blanc (notre échantillon de pâte n'ayant pas reçu d'inoculum).

La migration s'effectue successivement pendant 10 min à 20 volts et 720 min à 80 volts (Bio-Rad Power Pac 300).

Les bandes sont révélées après coloration dans un bain de BET (Bromure d'éthidium) (Promega H 5041 Frce) à 50 µg/mL pendant 20 min (Ampe *et al.*, 1999) suivi d'un rinçage à l'eau distillée sur un trans-illuminateur UV à 318 nm.

XII - L'analyse statistique des résultats

La classification des espèces bactériennes a été réalisée par classification hiérarchisée sur la base de leurs caractères phénotypiques obtenus après utilisation des galeries API par le logiciel Darwin 4.0 (94).

Le calcul des dissimilarités repose sur l'utilisation de l'équation de l'Indice de Dice (E1) basée sur la présence et/ou l'absence d'un caractère donné.

$$D(i, j) = b + c/2a + (b + c) \text{ (E1)}$$

a= nbre de caractères présents chez i et j

b= nbre de caractères présents chez i et absents chez j

c= nbre de caractères absents chez i et présents chez j

Résultats et Discussion

Résultats et discussion

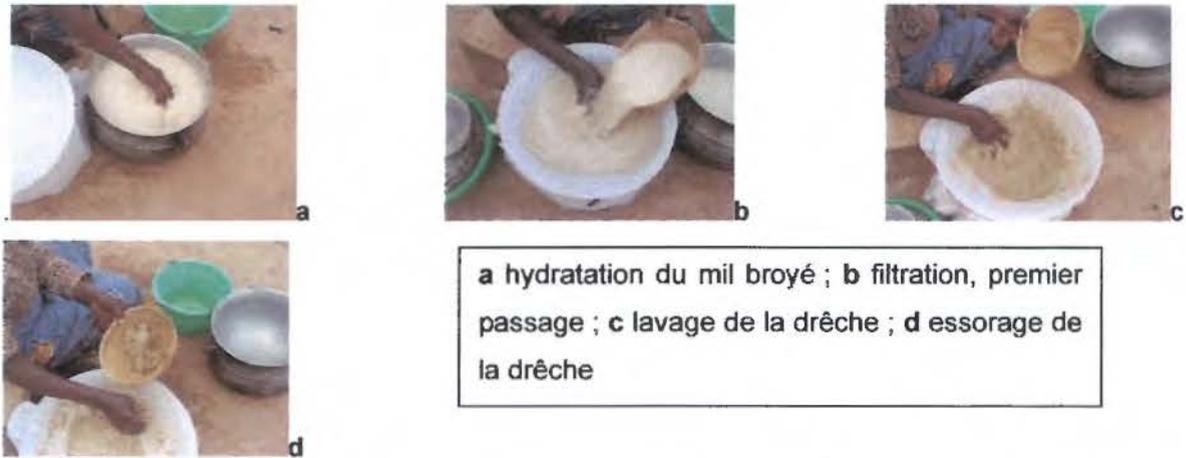
I - La numération, l'isolement et l'identification de la microflore non lactique des pâtes fermentées de mil de la commune de Ouagadougou (Burkina Faso)

Ici, notre objectif a été l'appréciation du niveau général de contamination, par le dénombrement et la caractérisation des différents groupes bactériens, des bouillies fabriquées dans les dix ateliers traditionnels ayant servi à la réalisation de notre étude. Le niveau de contamination est évalué successivement sur milieu MacConkey sans cristal violet (MC) pour les bacilles Gram- en particulier les entérobactéries, sur milieu Mannitol-Egg-Yolk-Polymyxin (MYP) pour les *Bacillus*, sur milieu Baird-Parker (BP) pour les staphylocoques, sur milieu Tryptone Sulfite Cyclosérine (TSC) pour les sulfito-réducteurs en particulier les *Clostridium*. Les isollements de germes caractéristiques nous ont permis par la suite de réaliser des identifications. Sur cette base, une idée générale sur la qualité microbiologique de ces aliments de grande consommation sera dégagée.

I.1. - L'évaluation de la microflore non lactique présente dans les bouillies *ben-saalga* et *ben-kida*

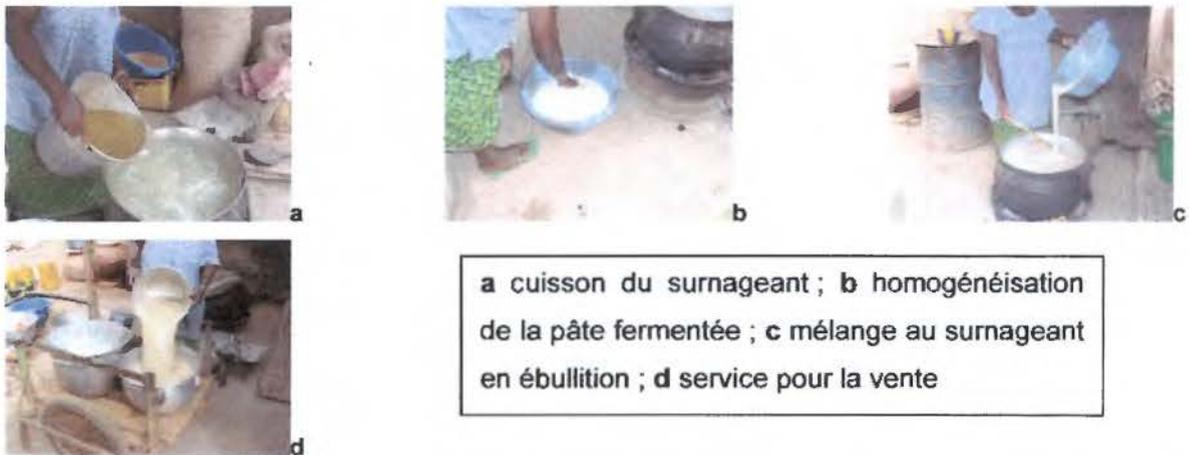
I.1.1. - Les caractéristiques des ateliers de fabrication et des prélèvements

Il en ressort que le taux de matière sèche (Tableau 10) reste faible pour les pâtes en début de fermentation (min 4%, max 9%) et pour les bouillies après cuisson (min 7, max 9%). Il reste relativement élevé pour la pâte fermentée. Ces résultats sont en accord avec le procédé de fabrication. Les productrices, lors de la filtration du mil broyé (Figure 9), font un ajout massif d'eau pour le lavage des drêches (Figure 9c). A la fin de la fermentation, une concentration de la pâte intervient à la suite du retrait du surnageant qui devra servir ultérieurement à la cuisson de la bouillie (Figure 10a). Au cours de la cuisson (Figure 10), le mélange est reconstitué par ajout de l'eau surnageante suivi d'une légère concentration due à l'ébullition de l'ensemble. La pâte en cours de fermentation de l'atelier 7 présente un taux plus élevé de matière sèche (13%) parce que la productrice a fait le choix de réaliser moins de cycles de lavage (Tableau 10).



a hydratation du mil broyé ; b filtration, premier passage ; c lavage de la drêche ; d essorage de la drêche

Figure 9 : Les différentes étapes de la filtration du mil broyé au cours de la préparation des bouillies traditionnelles à Ouagadougou



a cuisson du surnageant ; b homogénéisation de la pâte fermentée ; c mélange au surnageant en ébullition ; d service pour la vente

Figure 10 : Les différentes étapes de la cuisson de la pâte de mil fermentée au cours de la préparation des bouillies traditionnelles à Ouagadougou

1.1.2 - Les niveaux de contamination en fonction des étapes de fabrication et des sites de production

Tous les échantillons prélevés dans les sites visités présentent des niveaux variés de contamination pour chacun des groupes bactériens recherchés. Ces bactéries ont différentes origines possibles comme la matière première, les ingrédients aromatiques, l'eau utilisée, les ustensiles de cuisine, l'environnement de travail et les fabricantes (Kunene *et al.*, 1999 ; Stoll *et al.*, 2004 ; Giffel *et al.*, 1996), sans toutefois oublier les bouillies fermentées cuites mal manipulées, stockées et conditionnées de façon inadaptée (Kunene *et al.*, 1999). Le tableau 11 donne les résultats des dénombrements réalisés sur les échantillons de produits prélevés dans les 10 ateliers (Les détails sont à l'annexe 1).

Tableau 10 : Caractéristiques des échantillons de produits prélevés dans les 10 ateliers à Ouagadougou

N°site - Nom Productrice	Adresse (secteur/rue)	Variété de bouillie	Niveau prélèvement	Matière sèche	pH/Température
1- Moné Awa	9/29	<i>ben-saalga</i>	Pâte en cours de fermentation	7,46%	6,45/28°C
			Pâte fermentée	16,78%	3,78/24°C
			Bouillie cuite	7,88%	3,90/32°C
2- Abibou Bonkougou	17/284	<i>ben-kida</i>	Pâte en cours de fermentation	8,32%	6,10/29°C
			Pâte fermentée	23,67%	3,72/24°C
			Bouillie cuite	9,02%	3,92/30°C
3- Sanké Faty	17/282	<i>ben-kida</i>	Granules	79,30%	-
			Pâte en cours de fermentation	4,46%	6,46/26°C
			Pâte fermentée	18,27%	3,75/24°C
4- Diasso Bibata	16/163	<i>ben-kida</i>	Bouillie cuite	7,02%	4,13/32°C
			Granules	81,22%	-
			Pâte en cours de fermentation	8,87%	6,27/25°C
5- Sanfo Fatima	28/574	<i>ben-kida</i> (broyage à sec)	Pâte en cours de fermentation	27,40%	3,75/25°C
			Pâte fermentée	6,48%	3,85/32°C
			Bouillie cuite	5,86%	3,55/33°C
6- Zongo Hassana	28/564	<i>ben-saalga</i> (broyage à sec)	Granules	79,91%	-
			Pâte en cours de fermentation	4,40%	5,87/27°C
			Pâte fermentée	17,70%	3,65/27°C
7- Fatima Ouédraogo	3/97	<i>ben-saalga et ben-kida</i> (broyage à sec)	Bouillie cuite	5,86%	3,55/33°C
			Pâte en cours de fermentation	80,30%	-
			Pâte fermentée	8,40%	5,85/26°C
8- Bikiéga Assiata	23/43	<i>ben-kida</i> (broyage à sec)	Pâte en cours de fermentation	34,30%	3,65/28°C
			Pâte fermentée	7,60%	3,95/33°C
			Bouillie cuite	13,54%	5,52/26°C
9- Compaoré Marguerite	7/01	<i>ben-kida</i> (utilisation jus de tamarin pour la fermentation)	Pâte en cours de fermentation	32,05%	3,56/28°C
			Pâte fermentée	6,83%	3,66/31°C
			Bouillie cuite	6,83%	3,66/31°C
10- Assiata Ouédraogo	Inter 2/17 et 2/18	<i>ben-saalga</i>	Granules	80,79%	-
			Pâte en cours de fermentation	9,25%	5,92/27°C
			Pâte fermentée	29,48%	3,75/28°C
9- Compaoré Marguerite	7/01	<i>ben-kida</i> (utilisation jus de tamarin pour la fermentation)	Bouillie cuite	6,97%	3,84/32°C
			Pâte en cours de fermentation	83,74%	-
			Pâte fermentée	20,40%	6,17/27°C
10- Assiata Ouédraogo	Inter 2/17 et 2/18	<i>ben-saalga</i>	Bouillie cuite	7,00%	3,65/31°C
			Pâte en cours de fermentation	22,56%	5,20/29°C
			Pâte fermentée	22,56%	5,20/29°C
10- Assiata Ouédraogo	Inter 2/17 et 2/18	<i>ben-saalga</i>	Bouillie cuite	7,00%	3,65/31°C
			Pâte en cours de fermentation	81,30%	-
			Pâte fermentée	8,20%	6,50/26°C
10- Assiata Ouédraogo	Inter 2/17 et 2/18	<i>ben-saalga</i>	Pâte en cours de fermentation	26,55%	3,81/28°C
			Pâte fermentée	26,55%	3,81/28°C
			Bouillie cuite	5,85%	3,91/32°C

Tableau 11 : Niveaux totaux des populations d'entérobactéries, de *Bacillus*, de staphylocoques, de *Clostridium* dans les échantillons de pâtes de mil fermentées ou non, de granules et de bouillies prélevés chez 10 productrices de bouillies de mil fermentées à ouagadougou

N° site de production	Populations bactériennes dénombrées aux différentes étapes de fabrication (en log UFC/mL)				Populations bactériennes dénombrées en tenant compte des familles de microorganismes (en log UFC/mL)			
	PDF	PFF	G	B	Entérobactéries	Bacillus	Staphylocoques	Clostridium
1	4-7	4-6	ND	<1-1	<1-6	1-7	1-4	1-5
2	3-5	3-7	ND	<1-1	<1-5	1-7	2-3	<1-5
3	4-6	3-7	5-7	<1-1	<1-7	1-7	<1-5	<1-7
4	4-6	3-6	5-7	<1-1	<1-6	<1-7	<1-5	1-7
5	4-6	3-7	4-8	<1-3	<1-4	3-7	4-5	<1-8
6	3-4	<1-7	ND	<1	<1-3	<1-4	3	4-7
7	4-6	3-7	4-6	<1	<1-4	<1-5	<1-5	5-7
8	4-6	<1-5	4-7	<1	<1-7	<1-6	<1-6	<1-5
9	4-6	4-6	4-7	<1-5	<1-6	<1-6	4-6	4-7
10	4-6	<1-6	ND	<1-4	<1-5	<1-6	<1-4	4-6

PDF : Pâte en début de fermentation ; PFF : Pâte en fin de fermentation ; G : Granules ; B : Bouillie ; ND : Non déterminée

Remarque : Les détails des dénombrements sont à l'annexe 1

Dénombrement sur milieu Mac Conkey

Les dénombrements en entérobactéries et autres bactéries capables de croître sur milieu MC donnent des valeurs assez élevées (Tableau 11). Les plus élevées sont celles de la pâte avant fermentation ($4,0 \times 10^6$ UFC/mL au niveau de l'atelier 1) et dans les granules ($2,9 \times 10^7$ UFC/g au niveau de l'atelier 8). Hormis l'atelier 5 où la diminution de la population est très faible entre la pâte en début et fin de fermentation, nous constatons une réduction sensible d'une (ateliers 2, 3, 9) à deux réductions logarithmiques (ateliers 1, 4) après la fermentation de la pâte. Il existe même des cas d'ateliers (6, 7, 8, 10) où le niveau de population n'est pas mesurable après fermentation de la pâte. Une grande variation existe au niveau des populations dénombrées sur milieu MC pour ce qui est des granules (<10 UFC/g à $2,9 \times 10^7$ UFC/g). Le dénombrement après la cuisson donne des valeurs inférieures à 10 UFC/mL.

Différents facteurs peuvent être pris en compte pour expliquer les variations de populations dénombrées sur le milieu MC au cours du processus de fabrication (Tableau 9). Les entérobactéries peuvent contaminer les bouillies de céréales fermentées (Kunene *et al.*, 1999), elles sont affectées par l' a_w (activité de l'eau), la concentration en acides lactique et acétique, le pH, et la température (Ross *et al.*, 2003). Ainsi, la fermentation de la pâte caractérisée par une chute du pH (la production d'acides) s'accompagne d'une inhibition des entérobactéries (Duffy *et al.*, 1999 ; Ogwaro *et al.*, 2002 ; Ryuand and Beuchat, 1999). Des résultats similaires ont été obtenus lors de la fermentation du sorgho, du maïs, du mil (Kunene *et al.*, 1999 ; Mugula *et al.*, 2003). Ces auteurs ont montré que la chute du pH due à la production d'acide lactique permet d'éliminer les entérobactéries dans le milieu. Pour les granules, leur faible teneur en eau serait aussi un facteur déterminant qui affecterait le niveau de populations bactériennes. Les actions combinées du pH et de la température (cuisson) seraient importants permettant d'assurer une qualité sanitaire acceptable des bouillies (Duffy *et al.*, 1999 ; Ross *et al.*, 2003).

Dénombrements sur milieu Baird Parker

Les populations dénombrées varient entre $1,2 \times 10^3$ UFC/mL (atelier 6) et $5,1 \times 10^5$ UFC/mL (atelier 8) pour la pâte avant fermentation et de $8,0 \times 10^2$ UFC/mL (atelier 8) à $2,3 \times 10^5$ UFC/mL (atelier 4) à la fin du processus de fermentation. Pour la confection

des granules, elles oscillent dans l'intervalle $5,8 \times 10^4$ UFC/g (atelier 3) et $2,2 \times 10^6$ UFC/g (atelier 9). Après la cuisson, les populations de staphylocoques sont absentes dans 10g de produit (ateliers 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10) à $7,2 \times 10^4$ UFC/mL (atelier 9). L'incidence de la fermentation n'est pas notable sur la population de staphylocoques. Si nous faisons abstraction des résultats obtenus dans les ateliers 1, 2 et 9, la cuisson de la pâte fermentée permet de diminuer notablement la population dénombrable sur milieu Baird Parker.

Les staphylocoques sont les principaux microorganismes dénombrés sur milieu BP. Ils sont impliqués dans les cas de récontaminations à cause de leur présence sur la peau et dans le nez (Kusumaningrum *et al.*, 2003). Ce phénomène pourrait expliquer la faible variation de population entre les échantillons non fermentés et fermentés. Les pratiques manuelles, le manque d'hygiène des productrices, les phénomènes de recontaminations en font des germes difficiles à réduire par le simple fait de la fermentation des pâtes. Cependant, l'effet bénéfique du traitement thermique de cuisson, permet d'obtenir des résultats encourageant avec une absence de détection d'espèces dans 7 ateliers sur 10.

Dénombrement sur milieu de Mossel

Pour chacun des ateliers visités, les populations sur milieu MYP notamment *Bacillus* restent élevées (Tableau 11). Les valeurs de $1,5 \times 10^3$ UFC/mL (atelier 6) à $9,9 \times 10^6$ UFC/mL (atelier 1) ont été obtenues pour les pâtes en début de fermentation. Pour les pâtes fermentées les numérations varient de $3,5 \times 10^3$ UFC/mL (atelier 8) à $1,0 \times 10^7$ UFC/mL (ateliers 2 et 3), et pour les bouillies les valeurs varient d'une absence de germes (ateliers 4, 6, 7, 8, 9, 10) à $1,6 \times 10^3$ UFC/mL (atelier 5), enfin les numérations varient de $4,4 \times 10^4$ UFC/g (atelier 9) à $2,2 \times 10^7$ UFC/g (atelier 3) pour les granules. Cependant, si nous écartons les valeurs obtenues dans l'atelier 1, 2, 3 et 5 où nous dénombrons encore des populations après la cuisson, les traitements thermiques appliqués dans les autres ateliers semblent suffire pour obtenir une bouillie de qualité sanitaire acceptable pour le critère *Bacillus*.

Bacille sporulé, les *Bacillus* présenteraient des aptitudes à résister au traitement de fermentation subi par la pâte (Andersson *et al.*, 1995 ; Gaillard *et al.*, 1998a ; Sutherland *et al.*, 1996). La croissance quant à elle ne survient que pour des valeurs de pH comprises entre 4,5 et 9,3 (Gaillard *et al.*, 1998a ; Leguerinel *et al.*, 2000) et des domaines d' a_w supérieurs ou égal à 0,95 (Leguerinel and Mafart, 2001; Sutherland *et*

al., 1996 ; Valero *et al.*, 2003). Ces conditions se retrouvent en partie lors de la fermentation de la pâte, la résistance de ces germes et des phénomènes de contamination au cours du procédé pourraient expliquer l'augmentation observée entre le début et la fin de la fermentation. Reste cependant le danger dû à la présence des toxines pouvant être produites par des espèces de *Bacillus cereus* (Agata *et al.*, 2002 ; Borge *et al.*, 2001). Bien que l'entérotoxine diarrhéique soit inactivée par un traitement thermique (Beattie and Williams, 2002), la toxine émétique néoformée est capable de supporter lesdites conditions (Abriouel *et al.*, 2002 ; Lereclus *et al.*, 2004 ; Prüss *et al.*, 1999).

Dénombrement sur milieu TSC

Les populations moyennes en ce qui concernent les bactéries anaérobies strictes dénombrées sur milieu TSC à 46°C révèlent des similitudes avec les résultats obtenus sur milieu MYP (Tableau 11). La pâte avant fermentation présente des niveaux de population variant de $2,6 \times 10^4$ UFC/mL (atelier 6) à $4,1 \times 10^6$ UFC/mL (atelier 4). Le niveau des populations des pâtes en fin de fermentation varient de $3,0 \times 10^4$ UFC/mL (atelier 10) à $2,7 \times 10^7$ UFC/mL (atelier 7). Les granules incorporés lors de la confection du *ben-kida* sont contaminés à des niveaux moyens de population compris entre $2,5 \times 10^4$ UFC/g (atelier 8) et $9,2 \times 10^7$ UFC/g (atelier 5). La bouillie quant à elle présente des valeurs allant de l'absence de germes (ateliers 2, 5, 6, 7, 8) à $8,0 \times 10^3$ UFC/mL (atelier 10).

Ormis les échantillons des ateliers 1, 3, 4, 9 et 10, la cuisson permet de diminuer notablement les populations de germes dénombrés sur milieu TSC. Cette catégorie de bactéries, surtout les clostridies avec des temps de génération assez courts (de l'ordre de 8 minutes dans les conditions optimales) (Andersson *et al.*, 1995), est reconnue pour supporter les conditions de stress comme l'absence d'oxygène, le pH acide, les températures de pasteurisation (bactéries thermophiles) et de réfrigération (de Jong *et al.*, 2004 ; Guerlava *et al.*, 1998). Mais contrairement à *Bacillus*, ces bactéries anaérobies strictes, ne survivent pas longtemps sur les surfaces. Enfin, il a été prouvé que des espèces de *Clostridium perfringens* reconnues comme ne produisant pas d'entérotoxines pouvaient, après une succession de sporulation et de choc thermique (75°C pendant 20 min), se transformer en germes toxigènes (Andersson *et al.*, 1995).

L'absence de détection de germes anaérobies dans les bouillies de la moitié des ateliers et quand elles sont détectables, avec un maximum de population de l'ordre de 3 log décimaux (atelier 10) attestent de l'effet bénéfique de la cuisson, en accord avec les travaux réalisés par Kunene *et al.* (1999) sur le dénombrement des populations bactériennes dans les bouillies fermentées de sorgho.

I.2. - L'identification des espèces microbiennes isolées

L'identification a porté sur un total de 449 isolats obtenus (en considérant les différences macroscopiques des colonies sur les milieux de dénombrements utilisés) sur les quatre milieux de dénombrements (Tableau 12). Après des tests biochimiques et microbiologiques d'orientation les isolats ont été identifiés au moyen de galeries API appropriées.

A cette identification phénotypique, nous avons adjoint une détection par PCR (Hansen *et al.*, 1998) et/ou immunologique (agglutination) pour affiner les résultats.

Tableau 12 : Nombre d'isolats récoltés au cours des différentes étapes de fabrication des bouillies de mil fermentées : cas des dénombrements sur milieux MacConkey, Mossel, Baird-Parker et TSC

<i>Etape de prélèvement</i>	<i>Répartition des bactéries</i>			
	Milieu MacConkey	Milieu MYP	Milieu Baird Parker	Milieu TSC
Pâte en cours de fermentation	53	49	37	38
Pâte fermentée	27	43	39	36
Bouillie	0	10	9	10
Granules	25	27	24	22
Total	105	129	109	106

1.2.1. - Les coques à Gram positif non staphylocoques

87 souches ont été identifiées comme appartenant à la famille des *Streptococcaceae* et semblent toutes appartenir au genre *Leuconostoc*. Nous n'avons donc pas jugé bon de continuer l'identification, notre objectif étant la recherche des streptocoques bêta hémolytiques.

1.2.2. - Les *Bacillus*

La quasi-totalité des échantillons provenant des sites étudiés sont contaminés par des germes du genre *Bacillus* (Tableau 13 et 14). Le milieu MYP, conformément à ce qu'il fallait en attendre, a permis d'isoler plus de 62% des espèces (*Bacillus*) suivi du milieu BP (31%). Des cinq espèces identifiées, l'espèce *Bacillus cereus* 1 semble être la plus souvent rencontrée (48,3% des souches identifiées) suivie des espèces *B. coagulans* et *B. cereus* 2.

Tableau 13 : Identification des isolats de *Bacillus* prélevés aux différents stades de fabrication des bouillies

Espèces bactériennes	Etapas de fabrication				Total des germes isolés sur			% d'identification selon API
	A	B	C	D	MC	BP	MYP	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	1	2	0	0	1	1	1	77,9 ⁽⁴⁾ -96,0
* <i>Bacillus cereus</i> 1	4	9	0	1	1	3	10	77,5 ⁽⁵⁾ ⁽⁶⁾ -96,9
** <i>Bacillus cereus</i> 2	2	2	1	0	0	2	3	97,2-99,9
<i>Bacillus circulans</i> 2	1	0	0	0	0	0	1	99,1
<i>Bacillus coagulans</i>	3	3	0	0	0	3	3	64,2 ⁽¹⁾ ⁽²⁾ ⁽⁶⁾ ⁽⁷⁾ - 85,5 ⁽³⁾
Total	11	16	1	1	2	9	18	

Légende :

A : avant fermentation de la pâte
 B : après fermentation de la pâte
 C : après cuisson de la pâte
 D : granules
 MC : milieu Mac Conkey sans cristal violet
 BP : milieu Baird Parker
 MYP : milieu Mannitol egg Yolk Polymyxin

⁽¹⁾ Faible discrimination entre *Bacillus coagulans*, *Bacillus megaterim* 2 et *Bacillus circulans*

⁽²⁾ Faible discrimination entre *Bacillus coagulans* et *Bacillus lentus*

⁽³⁾ Faible discrimination entre *Bacillus coagulans*, *Bacillus cereus* 1 et *Bacillus subtilis*

⁽⁴⁾ Faible discrimination entre *Bacillus amyloliquefaciens* et *Bacillus licheniformis*

⁽⁵⁾ Faible discrimination entre *Bacillus cereus* 1 et *Bacillus mycoïdes*

⁽⁶⁾ Faible discrimination entre *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis* et *Bacillus amyloliquefaciens*

⁽⁷⁾ Faible discrimination entre *Bacillus coagulans*, *Bacillus lentus* et *Bacillus circulans* 2

⁽⁸⁾ Faible discrimination entre *Bacillus cereus* 1, *Bacillus mycoïdes* et *Bacillus anthracis*

**Bacillus cereus* du groupe 1 : spore non déformante de forme ellipsoïdale et cylindrique

***Bacillus cereus* du groupe 2 : production d'acide à partir du glucose et divers sucres, croissance anaérobie facultative, en particulier en présence de nitrates, spores de forme ellipsoïdale et non-déformante

Tableau 14 : Répartition des souches de *Bacillus* isolées dans les échantillons prélevés dans les 10 ateliers de fabrication

<u>Espèces bactériennes</u>	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	* <i>Bacillus cereus</i> 1	** <i>Bacillus cereus</i> 2	<i>Bacillus circulans</i> 2	<i>Bacillus coagulans</i>	Total
N° Site						
1		1				1
2	2	3	1			6
3						0
4						0
5		2				2
6			1			1
7		7		1	3	11
8			3		3	6
9		1				1
10	1					1
Total	3	14	5	1	6	29

Pour compléter la caractérisation des souches identifiées comme étant des *Bacillus cereus*, après l'utilisation des galeries API 50CHB, la technique PCR a été utilisée pour le typage des espèces par amplification partielle du gène *gyrB* (Figure 11) et de l'ADN ribosomal 16S (16S ADNr) (Figure 12) en utilisant des amorces spécifiques, et pour la détection du gène de l'hémolysine de *B. cereus* (Figure 13) et du gène codant pour le peptide non-ribosomique (Figure 14) impliqué dans la synthèse de la cereulide (toxine émétique) (Agata *et al.*, 2002 ; Toh *et al.*, 2004). Le résumé des tests est dans le tableau 15.

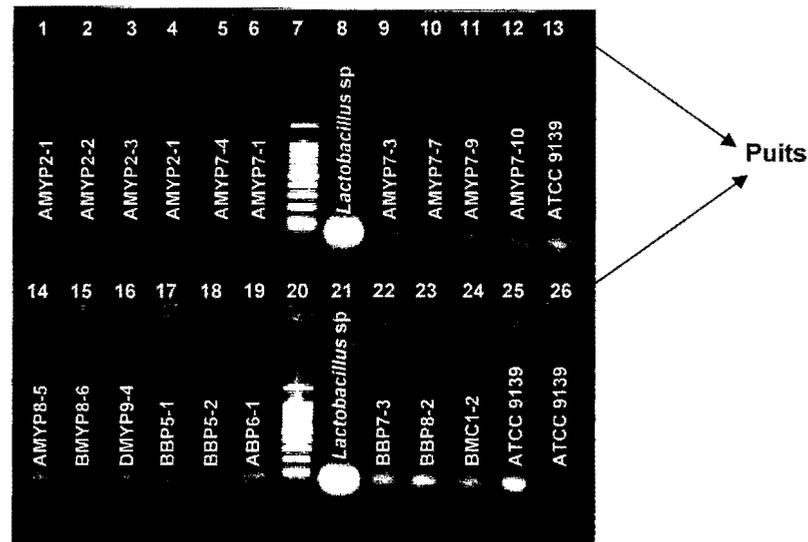


Figure 11 : Produits d'amplification du gène *gyrB* des espèces de *Bacillus* : gel à 1% w/w d'agarose (100 volts/ 40 min). Puits 7 et 20 Marqueur de poids 100 pb, puits 8 et 21 contrôle négatif *Lactobacillus* sp, puits 13, 25 et 26 souche de collection *B. cereus* ATCC 9139.

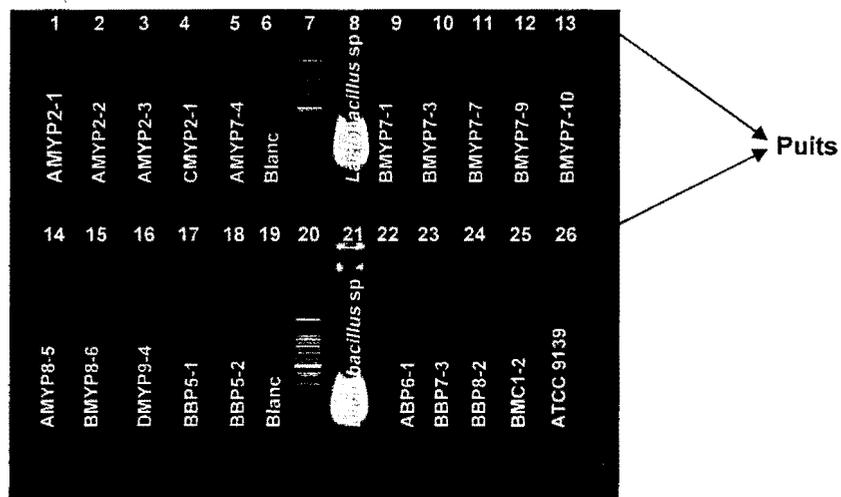


Figure 12 : Produits d'amplification de l'ADN ribosomal 16S : gel à 1% w/w agarose (120 volts/ 40 min). Puits 7 et 20 Marqueur de taille 100 pb, puits 6 et 19 Blanc, puits 8 et 21 contrôle négatif *Lactobacillus* sp, puits 26 souche de collection *B. cereus* ATCC 9139

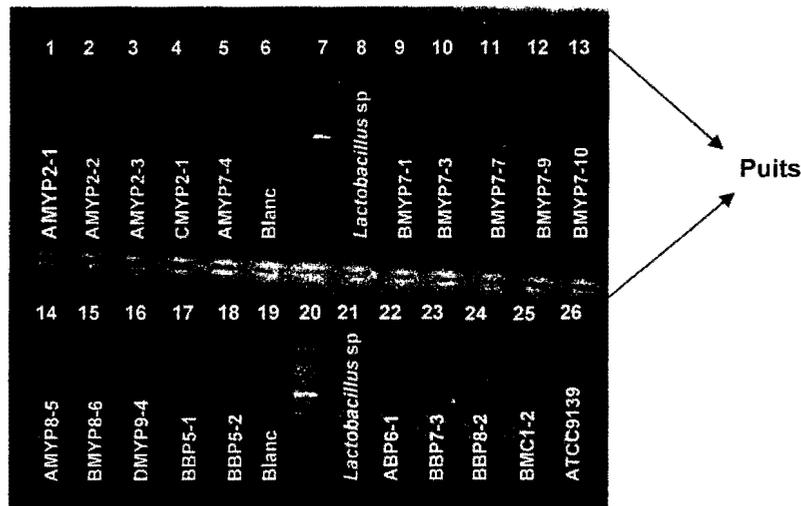


Figure 13 : Produits d'amplification du gène de l'hémolysine de *B. cereus*: gel à 1% w/w agarose (120 volts/ 40 min). Puits 7 et 20 Marqueur de poids 100 pB, puits 6 et 19 Blanc, puits 8 et 21 contrôle négatif *Lactobacillus* sp, puits 26 souche de collection *B. cereus* ATCC 9139.

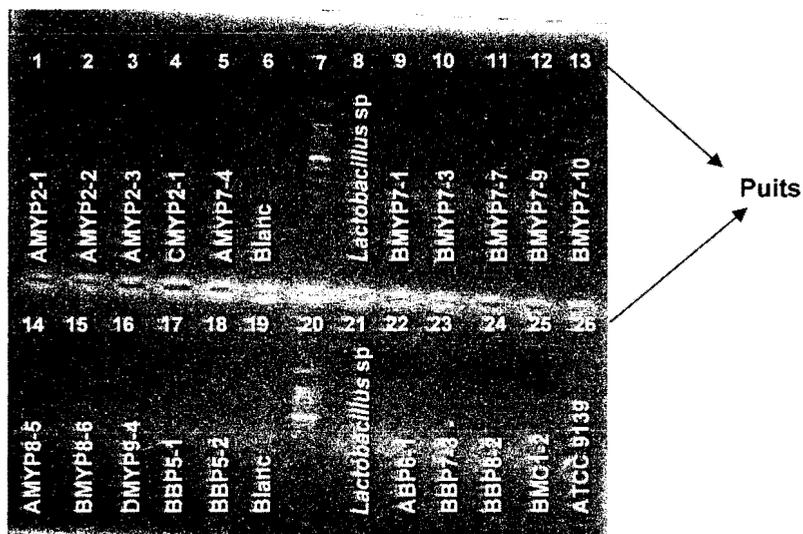


Figure 14 : Produits d'amplification du gène codant pour le peptide non-ribosomique impliqué dans la synthèse de la cereulide : gel à 1% w/w agarose (120 volts/ 40 min). Puits 7 et 20 Marqueur de poids 100 pB, puits 6 et 19 Blanc, puits 26 souche de collection *B. cereus* ATCC 9139.

Tableau 15 : Tableau récapitulatif de la caractérisation des isolats de *Bacillus cereus* par PCR

N°	Espèces	Résultats de l'amplification avec les amorces			
		BCFW1/BCRW1 (<i>gyrB</i>)	SS-Bc-200-a-S-18 /SS-Bc- 470-a-A-18 (ADN ribosomal 16S)	BC1 /BC2 (Hémolysine)	BEF /BER (Cereulide)
1	AMPYP2-1	+	-	-	-
2	AMYP2-2	+	-	-	-
3	AMYP2-3	+	+	-	-
4	CMYP2-1	+	+	-	-
5	AMYP7-4	+	-	-	-
6	BMYP7-1	+	-	-	-
7	BMYP7-3	+	-	-	-
8	BMYP7-7	+	-	-	-
9	BMYP7-9	+	-	-	-
10	BMYP7-10	+	+	-	-
11	AMYP8-5	+	-	-	-
12	BMYP8-6	+	+	-	-
13	DMYP9-4	+	+	-	-
14	BBP5-1	+	+	-	-
15	BBP5-2	+	+	-	-
16	ABP6-1	+	+	-	-
17	BBP7-3	+	+	-	-
18	BBP8-2	+	-	-	-
19	BMC1-2	+	+	-	-
20	<i>B. cereus</i> ATCC 9139	+	+	-	-

+/- : Amplification/Pas d'amplification

Les tests PCR réalisés montrent des produits d'amplification pour les souches de *Lactobacillus* sp. utilisées comme contrôle négatif et attestent de la non-spécificité des amorces ou des conditions utilisées pour les souches de *B. cereus* (Figures 11 et 12).

Par ailleurs, le contrôle positif utilisé est la souche de *B. cereus* ATCC 9139 de *B. cereus* n'a pas donné de produits d'amplification lors de la tentative d'amplification partielle de l'ADNr16S. Il n'est donc pas possible de conclure sur cette base à la caractérisation moléculaire des souches par amplification PCR.

Par ailleurs, bien que selon les tests sérologiques d'agglutination réalisés (Figure 15), les souches isolés seraient presque toutes productrices de la protéine L₂ impliquée dans la toxine diarrhéigène (Tableau 16), mais l'amplification du gène de cette protéine n'a rien donné comme la PCR réalisée pour amplifier le gène de la cereulide.

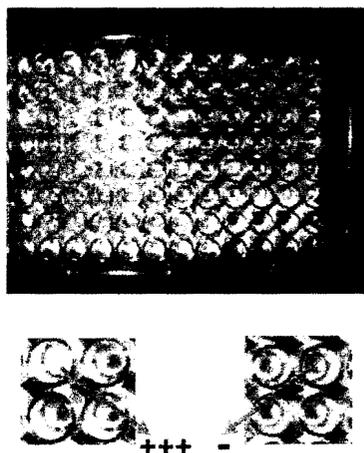
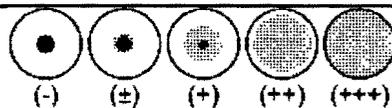


Figure 15 : Détection de la toxine diarrhéigène des espèces de *Bacillus cereus* par agglutination passive reverse de particules de latex (RPLA) (OXOID)

Tableau 16 : Résumé des résultats des tests d'agglutination réalisés sur les souches de *B. cereus* pour la détection de la présence de la toxine diarrhéigène

N°	Souches	Résultat des tests	Groupe de <i>B. cereus</i> présumé
1	AMPYP2-1	+++	1
2	AMYP2-2	+++	1
3	AMYP2-3	+++	1
4	CMYP2-1	++	2
5	AMYP7-4	+++	1
6	BMYP7-1	+++	1
7	BMYP7-3	+++	1
8	BMYP7-7	+++	1
9	BMYP7-9	+++	1
10	BMYP7-10	+++	1
11	AMYP8-5	-	2
12	BMYP8-6	-	2
13	DMYP9-4	-	1
14	BBP5-1	+++	1
15	BBP5-2	+++	1
16	ABP6-1	+++	2
17	BBP7-3	+	1
18	BBP8-2	-	2
19	BMC1-2	+++	1
20	<i>B. cereus</i>	+++	ATCC 9139



Les résultats classés de + à +++ sont considérés comme positifs.
d'agglutination selon le fabricant Oxoid, France)

1.2.3. - Les entérobactéries

Les échantillons prélevés dans les sites visités sont presque tous contaminés par des entérobactéries (Tableau 17). Contrairement au genre *Bacillus*, les étapes où nous avons identifié le plus d'entérobactéries sont la pâte non fermentée (étape A) et les granules (étape D). La majorité (55,3%) des entérobactéries ont été isolées des échantillons prélevés à l'étape A. La quasi-totalité (94,7%) des espèces caractérisées ont été isolées sur milieu MC. A l'étape B, nous avons une réduction considérable (environ 10 fois). Les ateliers 3 (5 espèces différentes) et 8 (4 espèces différentes) sont ceux qui présentent la plus grande diversité en entérobactéries.

L'espèce la plus souvent rencontrée est *Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae* (44,7% des souches caractérisées). Elle est rencontrée dans 4 ateliers différents. C'est un germe opportuniste qui est souvent cité (avec d'autres entérobactéries telles qu'*Enterobacter aerogenes*) dans les cas de biogénèse de l'histamine dans les aliments riches en acides aminés.

L'espèce *Escherichia coli* 1 (indicatrice de contamination fécale récente) se retrouve au niveau des sites 2 et 7 (Tableau 18). Sa présence aux étapes A et D pourrait être attribué à un défaut d'hygiène (personnel et ustensiles) lors du malaxage et tamisage de la farine de mil.

Tableau 17 : Identification des isolats d'entérobactéries prélevés aux différents stades de fabrication des bouillies

Espèces bactériennes	Etapas de fabrication				Total des germes isolés sur			% d'identification selon API
	A	B	C	D	MC	BP	MYP	
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	0	0	3	3	0	0	97,7
<i>Enterobacter asburiae</i>	0	0	0	2	2	0	0	82,3 ⁽³⁾
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	0	0	2	2	0	1	59,2 ⁽²⁾
<i>Enterobacter sakazakii</i>	3	0	0	0	3	0	0	98,4-99,5
<i>Escherichia coli</i> I	1	0	0	3	4	0	0	97,7-99,9
<i>Klebsiella pneumo. ssp pneumoniae</i>	11	1	0	5	17	0	0	97,7
<i>Klebsiella terrigena</i>	3	0	0	0	3	0	0	71,5 ⁽⁴⁾
<i>Rahnella aquatilis</i>	0	1	0	0	1	0	0	96,5
<i>Serratia liquefaciens</i>	2	0	0	0	1	0	1	93,9 ⁽¹⁾
Total	21	2	0	15	36	0	2	

Légende :

A : avant fermentation de la pâte
 B : après fermentation de la pâte
 C : après cuisson de la pâte
 D : granules
 MC : milieu Mac Conkey sans cristal violet
 BP : milieu Baird Parker
 MYP : milieu Mannitol Yolk Polymyxine

⁽¹⁾ Faible discrimination entre *Serratia liquefaciens* et *Serratia marcescens*

⁽²⁾ Faible discrimination entre *Enterobacter cloacae* et *Enterobacter sakazakii*

⁽³⁾ Faible discrimination entre *Enterobacter asburiae* et *Enterobacter cloacae*

⁽⁴⁾ Faible discrimination entre *Klebsiella terrigena* et *Klebsiella pneum./ pneumoniae*

Tableau 18 : Répartition des espèces d'entérobactéries isolées aux ateliers de fabrication

Espèces bactériennes	Enter. aerogenes	Enter. asburiae	Enter. cloacae	Enter. sakazakii	E. coli 1	Kleb. pneumo ssp pneumoniae	Kleb. terrigena	Rahnella aquatilis	Ser. liquefaciens	Total
1										0
2					1					1
3	2		1			5	3		2	13
4	1									1
5			1							1
6										0
7					3					3
8		2	1	2		5				10
9			1			3		1		5
10				1		3				4
Total	3	2	4	3	4	16	3	1	2	38

L'utilisation du milieu MacConkey Sorbitol (Figure 16) est préconisée dans le cas des tests de présomption. Ce milieu est utilisé comme test présomptif pour la recherche d'*E. coli* pathogène. Dans ce milieu, le lactose est remplacé par le sorbitol. Les souches potentiellement pathogènes ne fermentent pas le sorbitol et donnent des colonies incolores.

A l'opposé, les souches qui fermentent le sorbitol donnent des colonies roses à rouges et sont considérées comme non pathogènes.

Souche Pasteur ATCC 25922
Pathogène du groupe 2



Souche AMC2-1
BF atelier 2 av ferm de la pâte



Espèces DMC7-1, 7-3, 7-4
BF atelier 7 fabric. des granules



Figure 16 : Aspect de souches d'*E. coli* sur milieu MacConkey Sorbitol 24 heures à 35°C

A la vue des résultats (Fig. I-8), la souche AMC2-1 semble être une souche potentiellement pathogène. A ce titre, elle sera utilisée au cours des tests de croissance (challenge-tests).

1.2.4. - Les staphylocoques

A l'exception des sites 2, 6, 9 et 10, la présence du genre *Staphylococcus* a été mise évidence dans les autres sites (Tableau 20). Le test de la coagulation du plasma de lapin s'est révélé négatif dans la totalité des cas. On a une absence du genre *Staphylococcus* à l'étape C (cuisson). Les étapes A, B et D présentent des niveaux de contamination sensiblement équivalents (Tableau 19). Les ateliers 5 et 7 avec chacun 4 espèces différentes de *Staphylococcus* sont ceux qui présentent la plus grande diversité en staphylocoques.

Les 9 espèces identifiées sont toutes coagulase négative donc ne présenteraient à priori pas de dangers notables pour les individus (Tableau 21). Elles sont normalement associées à la peau, aux glandes cutanées. Par conséquent, leur présence serait le fait des manipulations manuelles des produits. L'espèce *Staph. xylosus* (27,8% des espèces caractérisées) est présente dans 3 ateliers. Une fois de plus, l'étape C reste décisive pour l'obtention d'un produit hygiéniquement acceptable. Le milieu BP reste un bon moyen de sélection du genre *Staphylococcus* (environ 89% des souches caractérisées).

Tableau 19 : Identification des isolats de Staphylocoques prélevés aux différents stades de fabrication des bouillies

Espèces bactériennes	Etapas de fabrication				Total des germes isolés sur			% d'identification selon API
	A	B	C	D	MC	BP	MYP	
<i>Staph. aureus</i>	1	0	0	1	0	1	1	97,8
<i>Staph. auricularis</i>	0	1	0	0	0	0	1	94,5
<i>Staph. caprae</i>	0	0	0	2	0	2	0	81,4 ⁽²⁾ -99,9
<i>Staph. Cohnii cohnii</i>	0	1	0	0	0	1	0	99,7
<i>Staph. epidermidis</i>	0	1	0	0	0	1	0	90,6
<i>Staph. Lentus</i>	0	2	0	0	0	2	0	99,9
<i>Staph. saprophyticus</i>	0	0	0	1	0	1	0	85,4 ⁽¹⁾
<i>Staph. simulans</i>	1	0	0	2	0	3	0	94,0-98,2
<i>Staph. xylosus</i>	5	0	0	0	0	5	0	99,4-99,8
Total	7	5	0	6	0	16	2	

Légende :

A : avant fermentation de la pâte

B : après fermentation de la pâte

C : après cuisson de la pâte

D : granules

MC : milieu Mac Conkey sans cristal violet

BP : milieu Baird Parker

MYP : milieu Mannitol Yolk Polymyxine

⁽¹⁾ Faible discrimination entre *Staphylococcus saprophyticus* et *Staphylococcus hominis*

⁽²⁾ Faible discrimination entre *Staphylococcus caprea* et *Staphylococcus aureus*

Tableau 20 - Répartition des différentes souches de Staphylocoques isolées des ateliers de fabrication

Espèces bactériennes	<i>Staph. aureus</i>	<i>Staph. auricularis</i>	<i>Staph. caprae</i>	<i>Staph. cohnii cohnii</i>	<i>Staph epidermidis</i>	<i>Staph. lentus</i>	<i>Staph. saprophyticus</i>	<i>Staph. simulans</i>	<i>Staph. xylosus</i>	Total
Ateliers de fabrication										
1						1				1
2										0
3					1	1				2
4									3	3
5	2		1					2	1	6
6										0
7		1	1				1	1		4
8				1					1	2
9										0
10										0
Total	2	1	2	1	1	2	1	3	5	18

Tableau 21 : Récapitulatif des caractères dominants des souches de *Staphylococcus* sp. sur milieu MEVAG et milieu Columbia au sang de mouton

Espèce bactérienne présumée	Aspect macroscopique sur milieu au sang	Aspect microscopique	Caractéristiques biochimiques			
			Oxydase	Catalase	Mevag	Respiration
<i>Staphylococcus</i>	Col blanches crémeuses, peu ou pas hémolytiques	Cocci en amas ou isolés, immobiles	-	+	Ferm. gluc	AAF
<i>Staph. aureus</i>	Col jaunes parfois blanches, généralement b hémolytiques	Cocci en amas ou isolés, immobiles				

AAF : aérobie-anaérobie facultatif ; **Ferm. gluc** : fermentation du glucose

1.2.5.- Les bacilles et coccobacilles à Gram négatif non entérobactéries

A l'exception des sites 2, 4 et 5, les autres sites sont contaminés par des bacilles et coccobacilles non entérobactéries à des différents niveaux (Tableau 23). Les étapes A et D présentent des niveaux de contamination relativement élevés (Tableau 22).

Exception faite des espèces *Aeromonas salm. ssp salmonicida* et *Pasteurella pneumotropica/haemolytica* qui pourraient être pathogènes dans certains cas, ces germes ne présentent pas en général un danger dans l'aliment. Une fois de plus, l'étape de cuisson reste décisive pour l'obtention d'un produit hygiéniquement acceptable. Le milieu MC montre son efficacité pour la sélection de cette catégorie de germes (environ 54% des souches caractérisées) suivi du milieu BP (29%).

Tableau 22 : Identification des souches de bacilles et coccobacilles non entérobactéries prélevés à différents stades de fabrication des bouillies

Espèces bactériennes	Étapes de fabrication				Total des germes sur			% d'identification selon API
	A	B	C	D	MC	BP	MYP	
<i>Aeromonas salm. ssp salmonicida</i>	0	0	0	3	0	0	3	99,0-99,9
<i>Burkholderia cepacia</i>	2	0	0	1	2	1	0	99,8
<i>Chryseomonas luteola</i>	8	3	0	4	10	5	0	99,4-99,8
<i>Pasteurella pneumotropica</i>	0	0	0	1	0	1	0	99,5
<i>/haemolytica</i>								
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	1	0	0	1	0	1	99,9
Total	11	4	0	9	13	7	4	

Légende :

- A : avant fermentation de la pâte
- B : après fermentation de la pâte
- C : après cuisson de la pâte
- D : granules
- MC : milieu Mac Conkey sans cristal violet
- BP : milieu Baird Parker
- MYP : milieu Mannitol Yolk Polymyxine

Tableau 23 : Répartition des différentes espèces de bacilles et coccobacilles non entérobactéries isolées aux ateliers de fabrication

Espèces bactériennes	<i>Aeromonas salm. ssp salmonicida</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Chryseomonas luteola</i>	<i>Pasteurella pneumotropica</i>	<i>/haemolytica</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Total
Ateliers de fabrication							
1		1	2			1	4
2							0
3	3		1	1			5
4							0
5							0
6			1				1
7		1	2				3
8		1	5				6
9			3				3
10			1			1	2
Total	3	3	15	1		2	24

1.2.6. - Les bacilles et coccobacilles à Gram positif anaérobies

Tous les sites sont contaminés par des bacilles et coccobacilles à Gram positif à des niveaux différents (Tableau 25). *Clostridium beijerinckii/butyricum* (56% des souches rencontrées) présentent dans la quasi-totalité des ateliers de fabrication d'autre part, est la plus rencontrée. C'est une espèce qui ne présente pas de danger lié à l'alimentation. Les étapes A et B sont celles où le plus grand nombre d'espèces différentes a été isolé. Après cuisson la diversité et le nombre de souches se réduisent considérablement. (Tableau 24).

Tableau 24 : Identification des souches de bacilles et coccobacilles à Gram positif anaérobies prélevés à différents stades de fabrication des bouillies

Espèces bactériennes	Étapes de fabrication				Total des germes sur milieu TSC	% d'identification selon API
	A	B	C	D		
<i>Clostridium beijerinckii /butyricum</i>	19	19	5	5	48	88,3 ⁽⁵⁾ -99,9
<i>Clostridium paraputrificum</i>	0	2	0	1	3	87,1 ⁽⁴⁾
<i>Clostridium difficile</i>	4	1	0	1	6	70,6 ⁽¹⁰⁾ - 97,2
<i>Clostridium speticum</i>	1	0	0	0	1	70,8 ⁽¹¹⁾
<i>Propionibacterium propionicus /avidum</i>	1	1	0	0	2	73,9 ⁽¹⁾
<i>Bifidobacterium spp 1</i>	1	5	2	4	12	52,9 ⁽³⁾ ⁽⁸⁾ - 99,8
<i>Actinomyces meyeri /odontolyticus</i>	1	3	0	3	7	52,7 ⁽²⁾ ⁽⁷⁾ - 99,2
<i>Actinomyces naeslundii</i>	1	0	0	0	1	69,5 ⁽⁶⁾
<i>Actinomyces israelii</i>	0	0	0	1	1	78,1 ⁽⁹⁾
<i>Lactobacillus fermentum</i>	0	0	0	1	1	72,7 ⁽²⁾
<i>Eubacterium limosum</i>	1	0	0	0	1	99,1
<i>Eubacterium lentum</i>	0	0	0	2	2	94,2
Total	29	31	7	18	85	

Légende :

A : avant fermentation de la pâte
 B : après fermentation de la pâte
 C : après cuisson de la pâte
 D : granules
 TSC : milieu Tryptone-sulfite-cyclosérine

- ⁽¹⁾ Faible discrimination entre *Propionibacterium propionicus /avidum* et *Actinomyces naeslundii*
⁽²⁾ Faible discrimination entre *Actinomyces meyeri /odontolyticus* et *Lactobacillus fermentum*
⁽³⁾ Faible discrimination entre *Bifidobacterium spp 1* et *Actinomyces meyeri /odontolyticus*
⁽⁴⁾ Faible discrimination entre *Clostridium paraputrificum*, *Clostridium barati* et *Clostridium ramosum*
⁽⁵⁾ Faible discrimination entre *Clostridium beijerinckii /butyricum* et *Clostridium clostridiiforme*
⁽⁶⁾ Faible discrimination entre *Actinomyces naeslundii* et *Bifidobacterium spp 1*
⁽⁷⁾ Faible discrimination entre *Actinomyces meyeri /odontolyticus* et *Bifidobacterium spp 1*
⁽⁸⁾ Faible discrimination entre *Bifidobacterium spp 1*, *Bifidobacterium spp 2* et *Actinomyces israelii*
⁽⁹⁾ Faible discrimination entre *Actinomyces israelii* et *Bifidobacterium spp1*
⁽¹⁰⁾ Faible discrimination entre *Clostridium difficile*, *Clostridium cadaveris* et *Clostridium bifermentans*
⁽¹¹⁾ Faible discrimination entre *Clostridium septicum*, *Clostridium paraputrificum* et *Clostridium barati*

Bifidobacterium spp 1 est un biotype. C'est-à-dire que c'est un sous-ensemble d'espèces ayant le même profil biochimique sur galerie API 20 A. Cette distinction permet d'améliorer les performances du système d'identification.

Tableau 25 : Répartition des différentes souches de bacilles et coccobacilles à Gram positif anaérobies isolées des ateliers de fabrication

Espèces bactériennes	<i>Clostridium beijerinckii</i>	<i>Clostridium paraputrificum</i>	<i>Clostridium difficile</i>	<i>Clostridium speticum</i>	<i>Propionibacterium propionicus</i> <i>/avidum</i>	<i>Bifidobacterium spp 1</i>	<i>Actinomyces meyeri</i> <i>/odontolyticus</i>	<i>Actinomyces naeslundii</i>	<i>Actinomyces israelii</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Eubacterium limosum</i>	<i>Eubacterium lentum</i>	Total
Ateliers de fabrication	<i>/butyricum</i>												
1	15												15
2	8												8
3	4				1	7	4			1			17
4	8	3											11
5						2		1					3
6	1					2	1						4
7	6		1				1		1				9
8	1		3		1	1					1	1	8
9			2				1					1	4
10	5			1									6
Total	48	3	6	1	2	12	7	1	1	1	1	2	85

I.3. -La classification hiérarchisée des souches isolées à l'aide du logiciel Darwin 4.0

Les dendrogrammes (Figures 17 à 22) ont été obtenus suite à l'analyse des dissimilitudes calculées en utilisant l'Indice de Dice (E1) basé sur la présence et/ou l'absence d'un caractère donné dans les tests biochimiques des API 50 CHE/B. Ces figures permettent de présenter de manière synthétique la diversité microbienne pour les différents groupes recherchés. Les différentes souches identifiées ont pu être regroupées de manière cohérente permettant ainsi de mieux repérer les souches phénotypiquement identiques ainsi que celles qui se différencient notablement des autres bien qu'ayant été identifiées comme identiques, par exemple les deux souches de *B. cereus* 2 qui ne sont pas regroupées dans le « grand » cluster réunissant l'ensemble des souches de *B. cereus* et autres *Bacillus* (Figure 17). Cette classification peut aussi être un instrument de gestion de la collection des souches constituées.

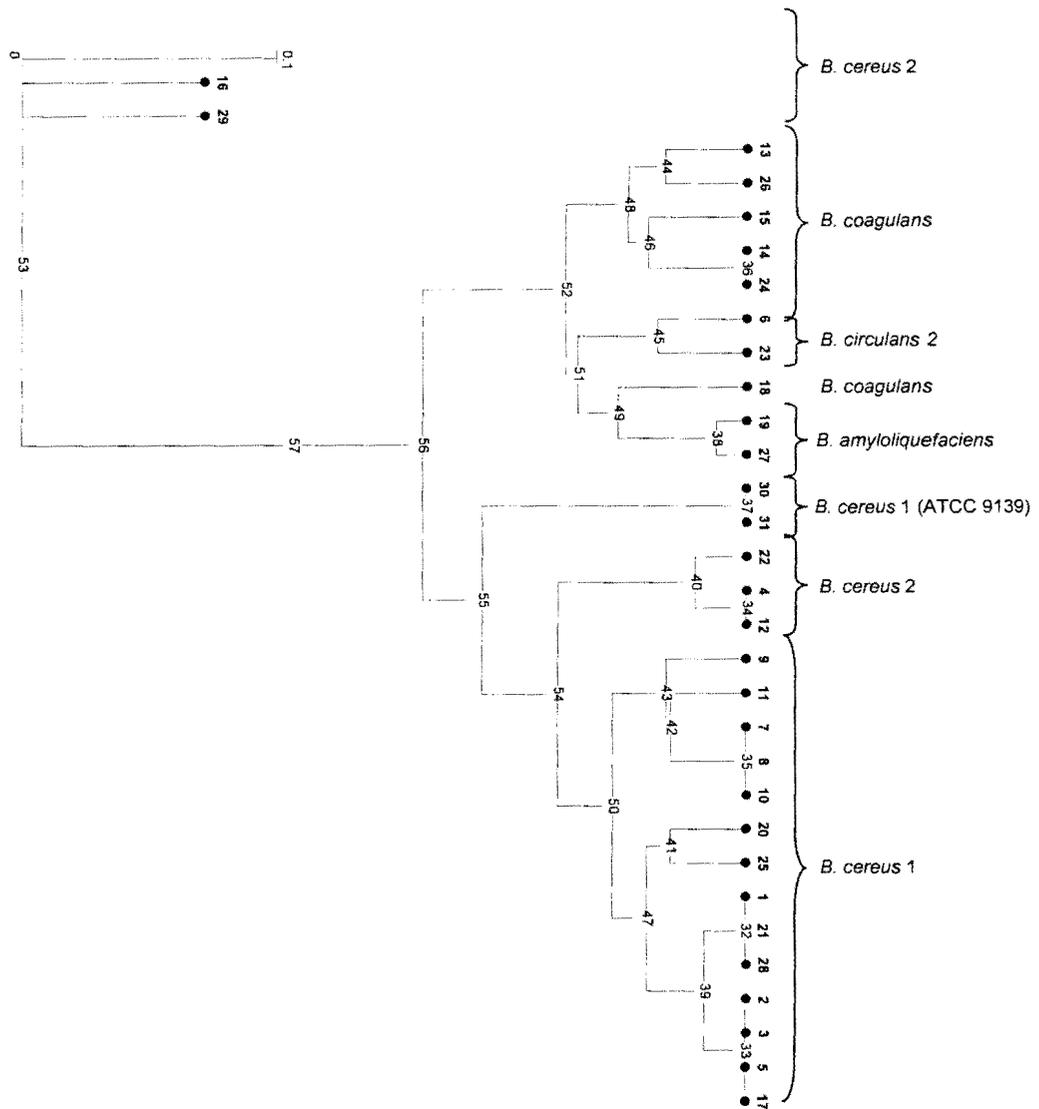
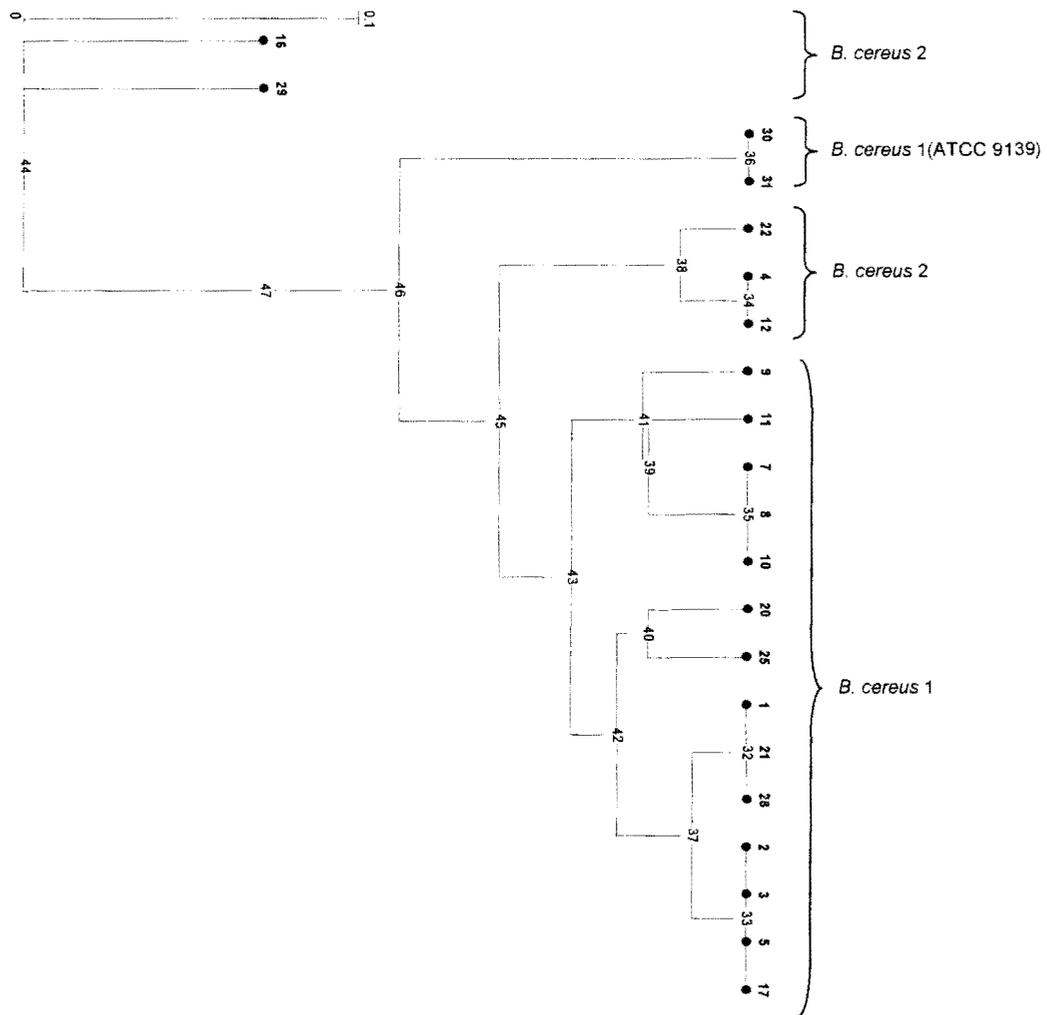


Figure 17 : Dendrogramme établi à partir des caractéristiques phénotypiques(galeries API 50 CHB/E) des souches isolées à Ouagadougou (Burkina-Faso)



Note : Les souches 29 et 16 diffèrent des autres *B. cereus* 2 d'un test à l'encontre

Figure 18 : Dendrogramme établi à partir des caractéristiques phénotypiques des souches de *Bacillus cereus* isolées à Ouagadougou (Burkina-Faso)

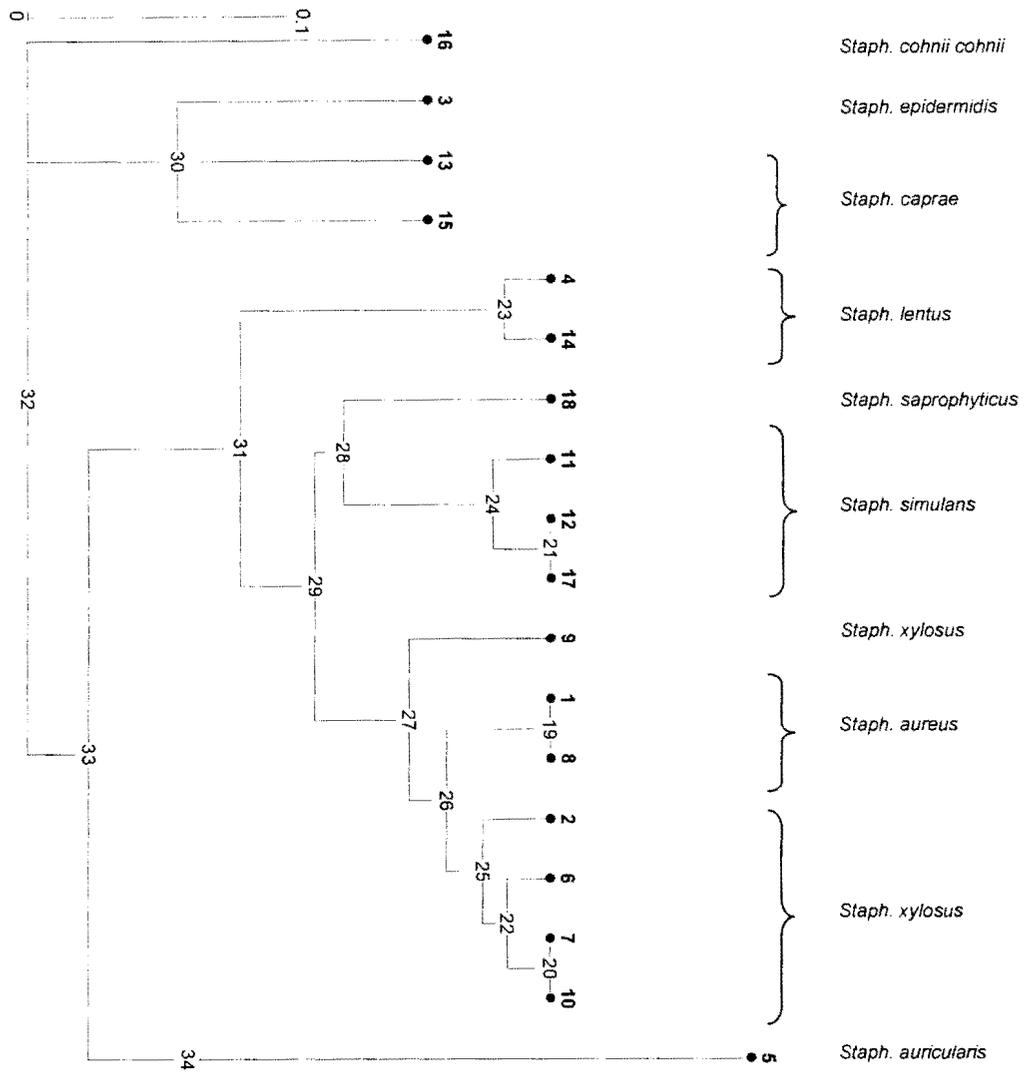


Figure 19 : Dendrogramme issu de l'identification à l'aide des galeries API Staph des souches isolées à Ouagadougou (Burkina-Faso)

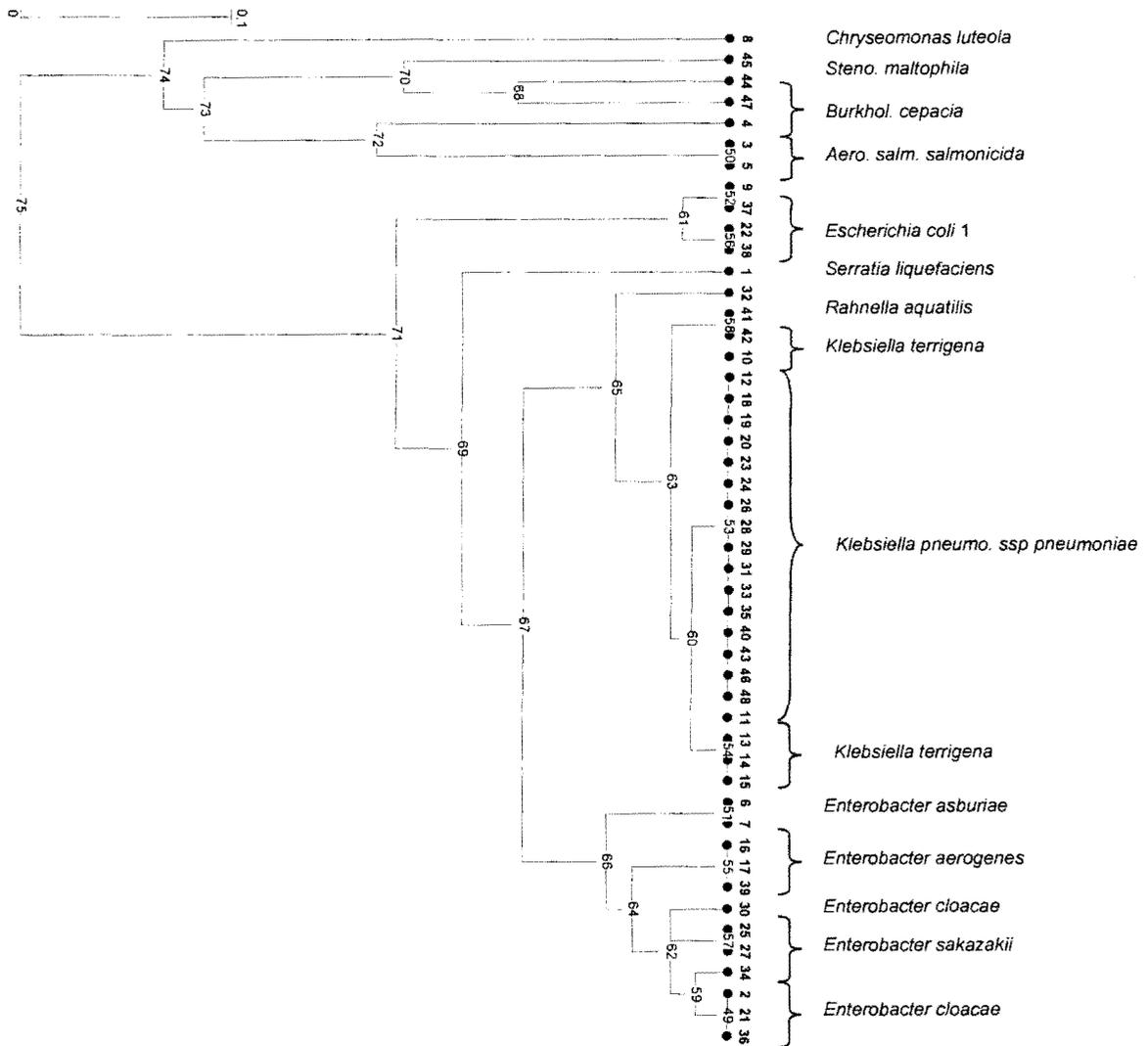


Figure 20 : Dendrogramme issu de l'identification à l'aide des galeries API 20 E des souches isolées à Ouagadougou (Burkina-Faso)

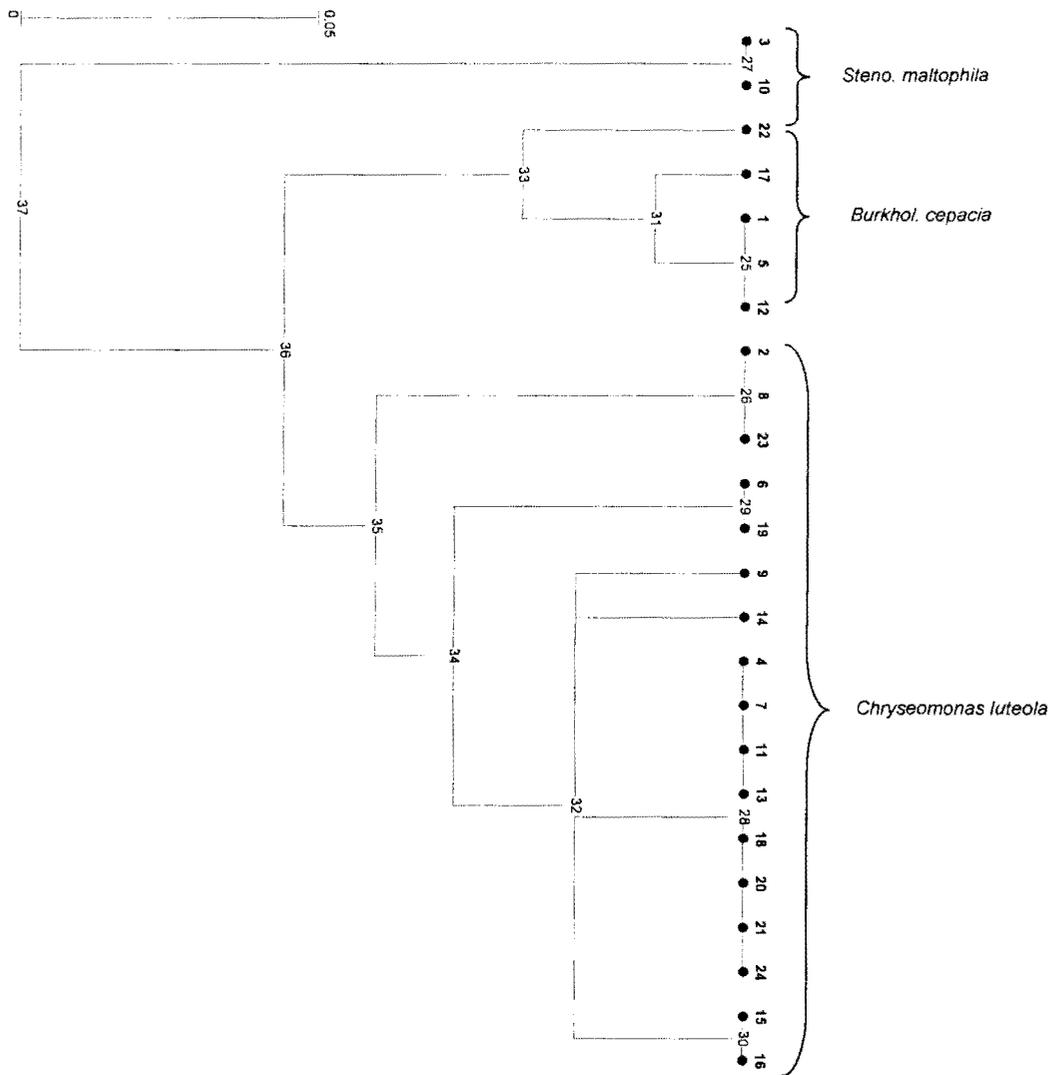


Figure 21 : Dendrogramme issu de l'identification à l'aide des galeries API 20 NE des souches isolées à Ouagadougou (Burkina-Faso)

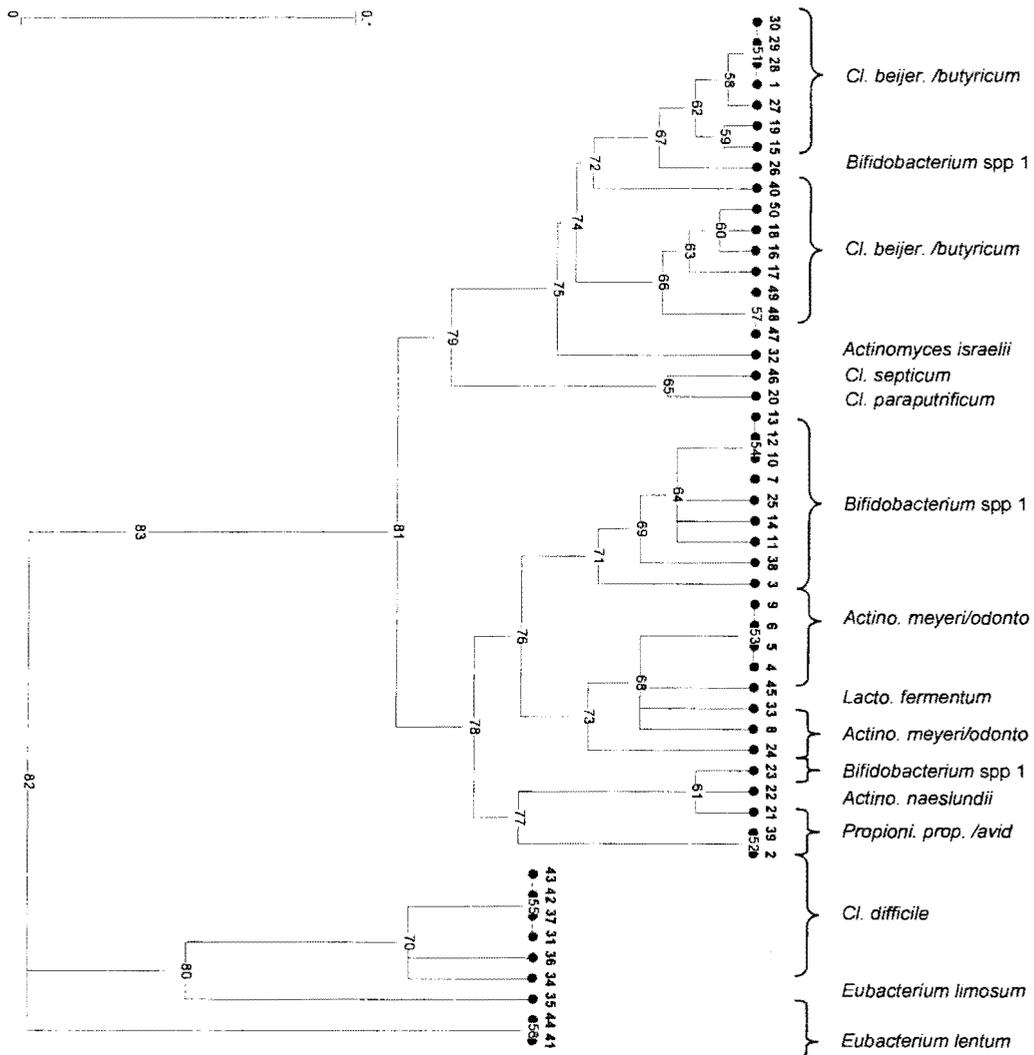


Figure 22 : Dendrogramme issu de l'identification à l'aide des galeries API 20 A des souches isolées à Ouagadougou (Burkina-Faso)

I.4. - L'application de la méthodologie HACCP aux sites de production

Dans les unités artisanales de fabrication d'aliments les différentes sources de contamination sont extrêmement diverses et peuvent être présentées de manière synthétique selon la Figure 23 (Motarjemi, 2002).

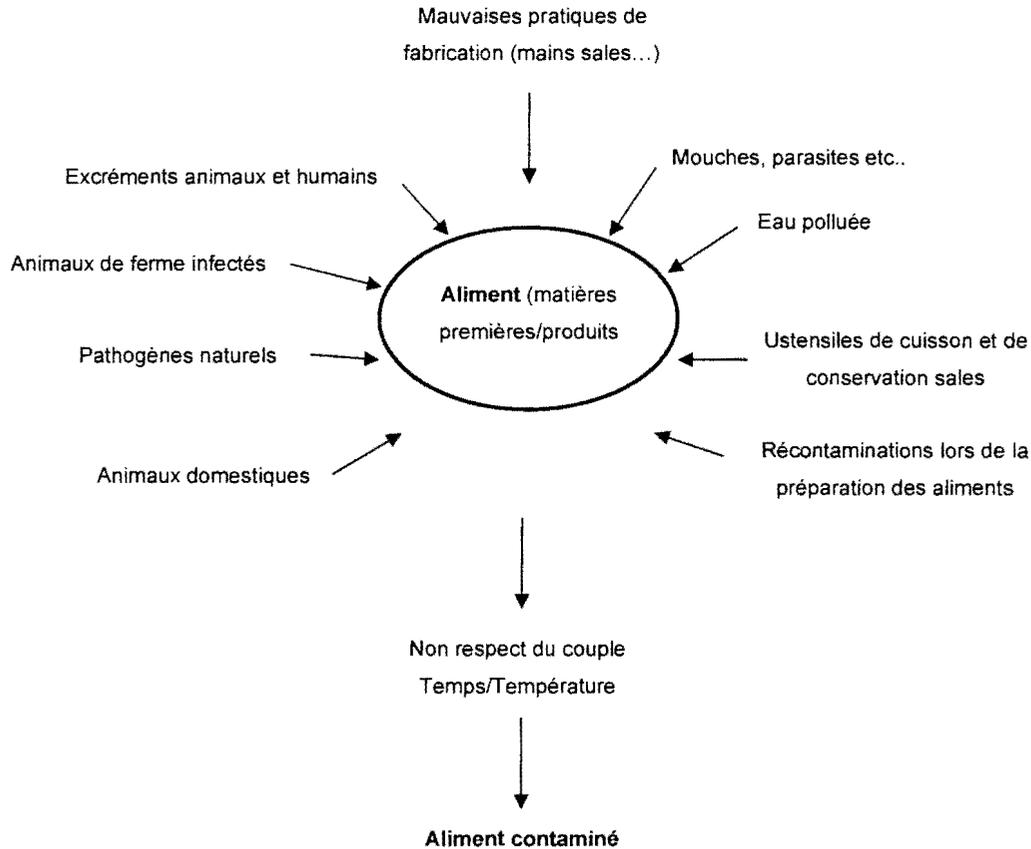


Figure 23 : Sources de contamination des aliments lors de la préparation d'aliments dans de petites unités de production (Motarjemi, 2002)

En appliquant cette démarche aux sites de fabrications visités (annexe 2), suite à une revue détaillée de la fabrication des bouillies conformément à la démarche HACCP (AFNOR, 2005) et sur la base des observations effectuées (annexe 2) que les étapes de décantation, de cuisson, et de commercialisation de la bouillie sont les étapes où le danger biologique est le plus important (Tableau 26). Ainsi, comme nous l'avons montré dans les chapitres précédents et en accord avec les travaux déjà réalisés par différents auteurs (Kunene *et al.*, 1999 ; Motarjemi, 2002 ; Whyte *et al.*, 2001), ce type d'aliment peut être contaminé par des germes aérobies ou non, sporulés ou non et pouvant être pathogènes. Mais une cuisson bien menée, accompagnée du respect de la propreté des ustensiles semble concourir à améliorer suffisamment l'état sanitaire des bouillies. Par contre, le problème majeur demeure la subsistance de toxines bactériennes non thermolabiles dans le produit fini.

Tableau 26 : Résumé des dangers identifiés lors des procédés de fabrication

Étapes du procédé	Types de dangers		
	Biologiques	Chimiques	Physiques
Matières premières (le mil, les ingrédients aromatiques, l'eau, le sucre)	Mycotoxines, les germes pathogènes	Les métaux toxiques	Les insectes, les bris de verre, les poussières, les corps étrangers
Lavage et égouttage			Les insectes, les bris de verre, les poussières, les corps étrangers
Broyage		La lubrification des équipements de broyage, les huiles de moteur	
Décantation de la pâte (fermentation)	Croissance des germes pathogènes, production de toxines		
Cuisson (ébullition du surnageant et addition de la pâte fermentée (et) des granules)	Thermorésistance des germes pathogènes et des toxines		Les corps étrangers
Bouillie (commercialisation)	Contaminations croisées (mains, ustensiles sales....)		Les corps étrangers

Remarque : Les détails de la démarche sont en annexe 2

I.5.- La conclusion et les perspectives liées à l'appréciation de la qualité des bouillies

Cette première partie d'étude a consisté à apprécier la qualité hygiénique des bouillies produites dans les ateliers de fabrication de la commune de Ouagadougou puis à identifier 449 espèces isolées au cours du procédé de fabrication.

Les protocoles de dénombrement, mettant en oeuvre des milieux sélectifs nous ont permis de mettre en évidence l'effet bénéfique de la fermentation lactique sur la réduction du nombre de bacilles et coccobacilles à Gram négatifs en général et d'entérobactéries en particuliers. Cependant, la présence de ces bactéries dans les produits fermentés montre qu'il existe des souches capables de résister au stress acide du milieu.

La caractérisation des espèces isolées a mis évidence la prédominance de l'espèce *Klebsiella pneumo. ssp pneumoniae* chez les entérobactéries et *Chryseomonas luteola* pour les non-entérobactéries. Ce sont tous des germes qui ne sont pas impliqués dans les cas de TIAC. Cependant, nous avons la présomption de la présence d'*E. coli* pathogène (sorbitol négatif) et d'*Enterobacter sakazakii* (Gurtler *et al.*, 2005 ; Kandhai *et al.*, 2004). Dans tous les cas, l'étape de cuisson permet de fournir un aliment exempt de ces espèces bactériennes. Pour ce qui est des coques à Gram positif, il n'a pas été caractérisé de streptocoques bêta hémolytiques.

Staph. xylosus est la plus représentée des espèces de staphylocoques. L'étape de cuisson permet de réduire notablement les populations de staphylocoques, cependant les souches identifiées ne présentent pas de dangers particuliers.

En ce qui concerne les bacilles sporulés, les différents dénombrements montrent que l'étape de fermentation de la pâte n'est pas efficace à elle seule pour réduire significativement les niveaux de population. Ce sont des germes telluriques probablement liés à l'origine végétale de la matière première et à la contamination environnante due aux poussières, car les récipients ne sont pas fermés. *Bacillus cereus* (bactérie microaérophile sporulée) et *Clostridium beijerinckii /butyricum* (anaérobie sporulée) sont les germes les plus rencontrés. La cuisson couplée à la fermentation permet de réduire considérablement les populations même si cette réduction n'est pas aussi spectaculaire que dans le cas des bactéries non sporulées. Il reste cependant le danger de la production de la cereulide par *B. cereus* qui est thermorésistante. Pour résumer, la présence *Bacillus cereus* constitue un danger majeur dans les bouillies.

La cuisson des pâtes fermentées permet de réduire les populations en *B. cereus*. Cependant des recontaminations des bouillies après cuisson sont possibles surtout si celles-ci ne sont pas consommées rapidement après leur préparation. Le danger lié à la présence de spores de *B. cereus* est présent à toutes les étapes de fabrication.

La recherche des dangers microbiologiques, met en exergue la qualité des matières premières utilisées, la maîtrise du processus de fermentation lors de la décantation de la pâte, la maîtrise de la cuisson (couple temps/température), les recontaminations liées à la qualité des ustensiles et à l'hygiène des productrices.

Forts des résultats obtenus nous donnant une typologie des bactéries impliquées dans les cas possibles des infections alimentaires, il serait judicieux de réfléchir sur la proposition de voies et moyens d'amélioration de la qualité des bouillies. Ils devront prendre en compte la facilité de leur mise en œuvre.

La technique des tests de croissance (Notermans *et al.*, 1993 ; Notermans and in't Veld, 1994 ; Villani *et al.*, 2005 ; Wilson *et al.*, 2002) couplée à l'utilisation des milieux de numération sélectifs (Iversen and Forsythe, 2004 ; Rompré *et al.*, 2002) et des méthodes moléculaires par PCR-DGGE (Ercolini, 2004 ; Florez and Mayo, 2006 ; Miambi *et al.*, 2003 ; Rantsiou *et al.*, 2005) semblent convenir parfaitement à nos objectifs.

II - L'étude de la croissance des espèces pathogènes sauvages ou de collection dans des pâtes de mil fermentées ou non par en présence ou en absence de nisine

L'étude de l'évolution de la population de microorganismes sous différentes conditions a été appréciée en utilisant la méthode des tests de croissance (ou challenge-tests). Elle a consisté à inoculer artificiellement un produit alimentaire avec des germes pouvant présenter un danger pour la santé des consommateurs et à faire subir au produit les traitements habituels de fabrication, de cuisson et de conservation. En fonction des résultats obtenus, l'utilisation d'agents antimicrobiens sera envisagée ou non. Les points d'inoculation des bactéries retenus sont guidés (Figure 24) par les observations lors de la démarche HACCP (principes 1 et 2) si nous ne considérons que les dangers biologiques (Tableau 26).

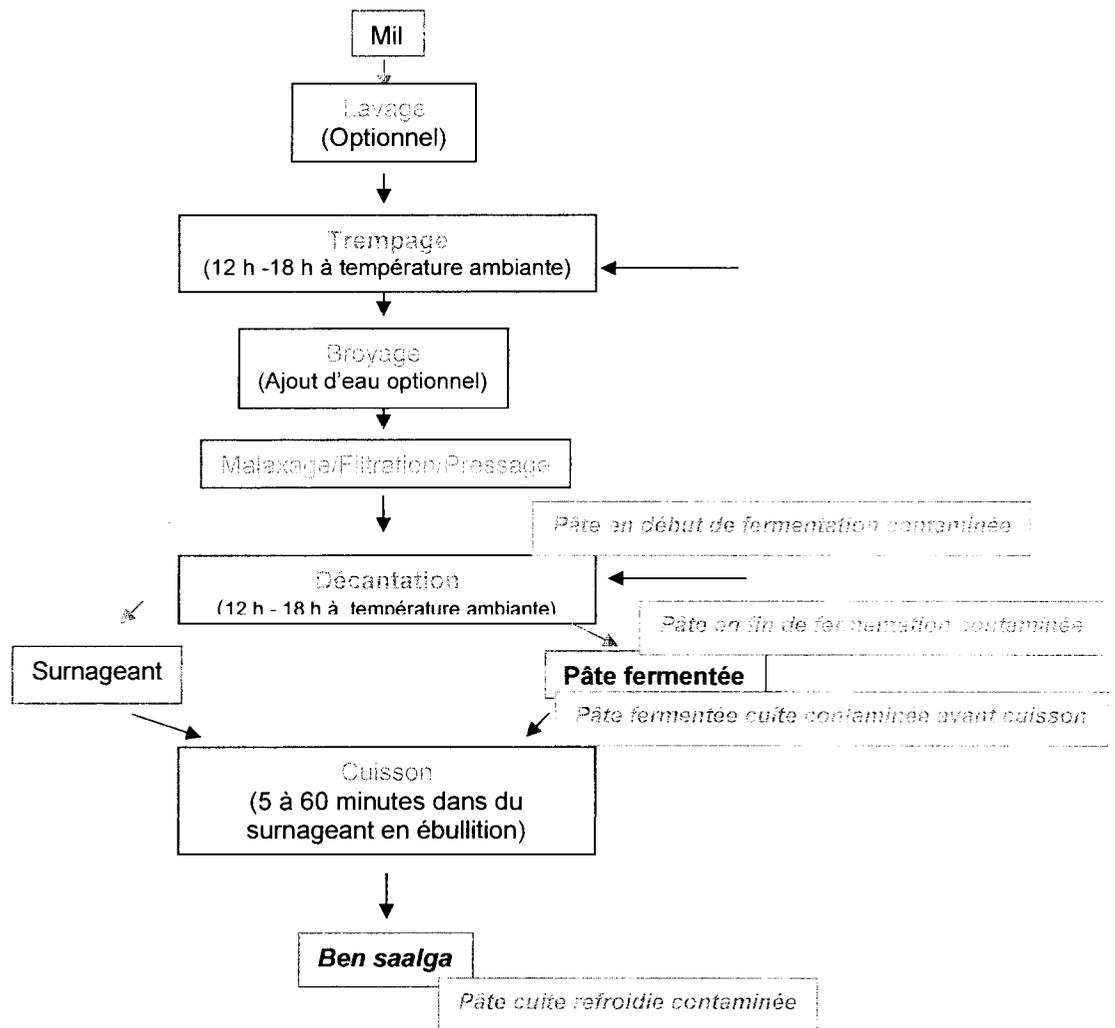


Figure 24 : Schéma simplifié des étapes de fabrication et des différents points (encadrés en rouge) d'application de tests de croissance

Les germes inoculés aux différentes étapes lors des tests de croissance que nous avons réalisés sont connus comme étant des souches identifiées dans différents cas de toxi-infections alimentaires (McCabe-Sellers and Beattie, 2004).

L'utilisation d'un agent antimicrobien comme la nisine pour améliorer de la qualité hygiénique des aliments a été retenue parce que c'est une bactériocine à spectre relativement large. De surcroît c'est la seule bactériocine dont l'usage est autorisé par l'OMS en alimentation (Cleveland *et al.*, 2001 ; Dufrenne *et al.*, 1994 ; Gill and Holley, 2000 ; Jamuna *et al.*, 2005 ; Samelis *et al.*, 2003).

II.1. – L'effet de la fermentation sur la survie des espèces présentant un danger sanitaire

Les études ont été réalisées avec des pâtes en cours de fermentation pour apprécier l'effet de la contamination par les souches pathogènes. L'évolution des populations en germes pathogènes dans les pâtes non fermentées (contrôles négatifs) a aussi été suivie grâce à la confection de pâtes utilisant des grains de mil pasteurisés à l'étuve (80°C/30 min).

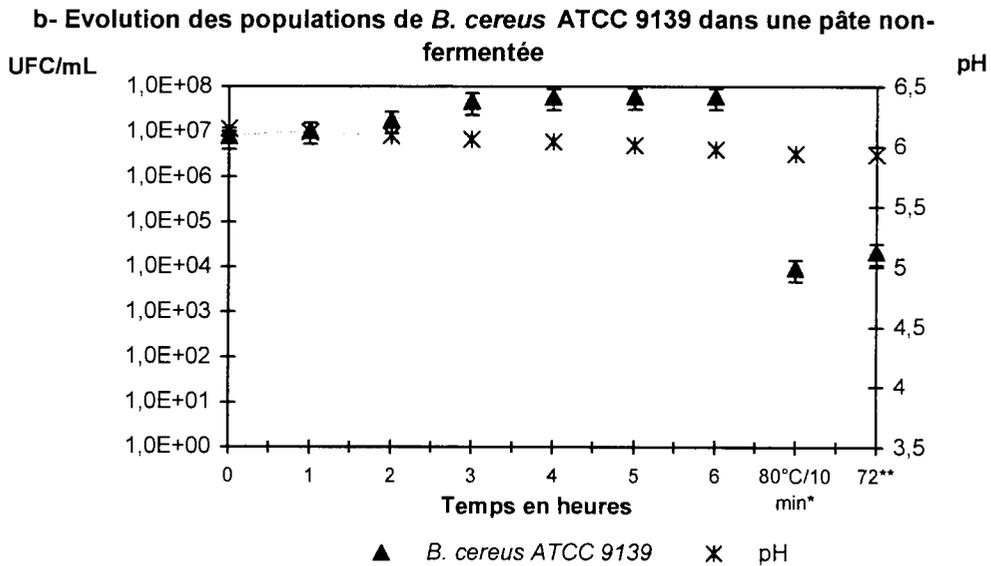
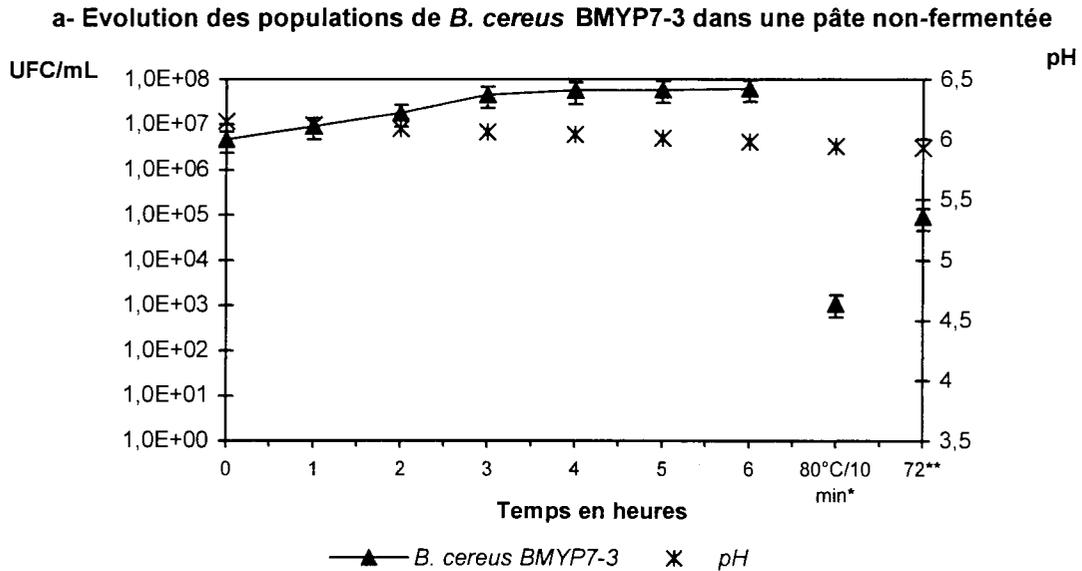
II.1.1. – L'étude de la contamination par les espèces de *B. cereus*

Concernant l'évolution des populations de *B. cereus* dénombrées sur milieu MYP, on observe une population initiale (à T_0) de l'ordre de 10^5 à 10^6 UFC/mL pour chacune des souches inoculées dans la pâte en cours de fermentation et de l'ordre de 10^6 à 10^7 UFC/mL pour le contrôle négatif (Figure 25). Pour les essais avec les pâtes en cours de fermentation, la population décroît faiblement pour se stabiliser entre 10^4 à 10^5 UFC/mL de pâte alors que pour les contrôles négatifs, c'est-à-dire sur les pâtes non fermentées, la population de la souche pathogène inoculée augmente (Figure 26), indiquant que le milieu est au moins propice à la survie, voire au développement de ce germe.

Un traitement thermique de 80°C (mesuré à cœur) pendant 10 minutes est efficace pour détruire les formes végétatives des bactéries mais insuffisant pour conduire à la destruction des spores bactériennes (Haque and Russell, 2005). Il s'en suit, pour le contrôle réalisé avec la pâte non fermentée, une diminution de l'ordre de 4 log décimaux de la population bactérienne suivie d'une croissance d'un log après 72 heures pour atteindre une population avoisinant les 10^4 UFC/mL. A contrario, le même traitement appliqué en cours de fermentation semble sans effet sur la population de la souche pathogène. Le niveau de population après traitement est de même ordre grandeur qu'avant (Figure 26).

Cela suggère que l'essentiel des souches de *B. cereus* dénombrées durant le processus de fermentation seraient sous forme sporulée, alors que celles dénombrées dans la pâte non fermentée seraient sous leur forme végétative. L'acidification du milieu au cours du processus de fermentation pouvant induire la sporulation de la bactérie (Andersson *et al.*, 1995 ; Rosslund *et al.*, 2005b), *B. cereus* serait, par conséquent, capable de survivre « massivement » à l'étape de cuisson ; ainsi, contre toute attente, au lieu d'avoir un effet barrière dû au cumul des effets recherchés de la fermentation et de la cuisson (« hurdle

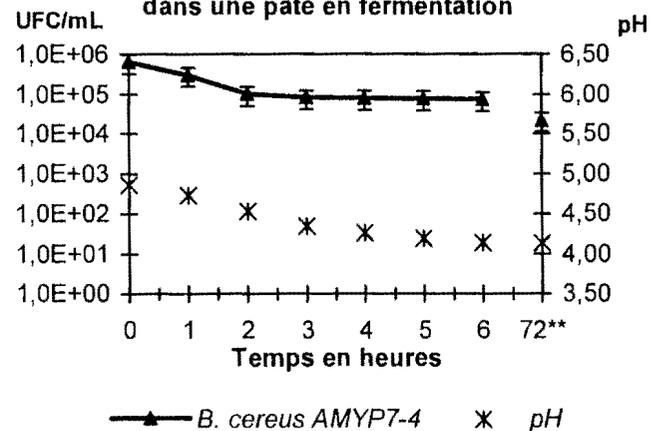
technology »), nous pourrions avoir tout au contraire, pour ce type de microorganisme, un effet négatif non recherché si le barème de cuisson non adéquat est appliqué. Il y a donc bien un danger qui paraît spécifique au processus de transformation faisant intervenir une étape de fermentation.



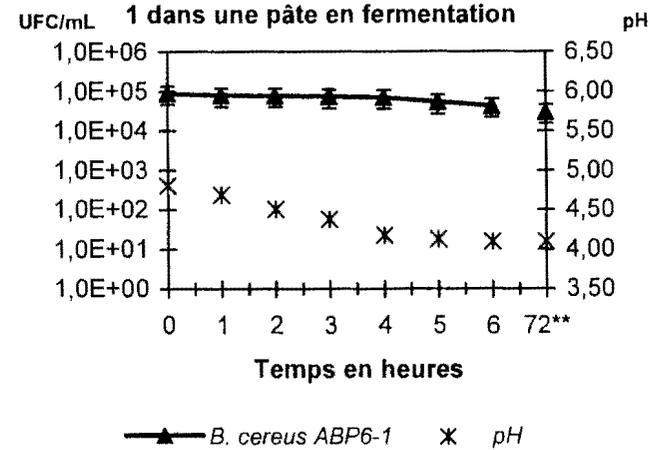
*échantillon traité 10 minutes à 80°C pour détruire les formes végétatives ;**incubation à 30°C pendant 72h de l'échantillon traité à 80°C/10min puis refroidi

Figure 25 : Évolution de la population de *B. cereus* dans une pâte non fermentée fabriquée avec du mil pasteurisé.

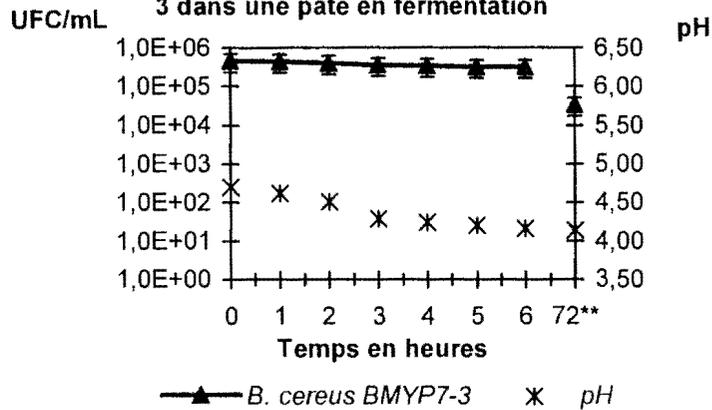
a- Evolution des populations de *B. cereus* AMYP7-4 dans une pâte en fermentation



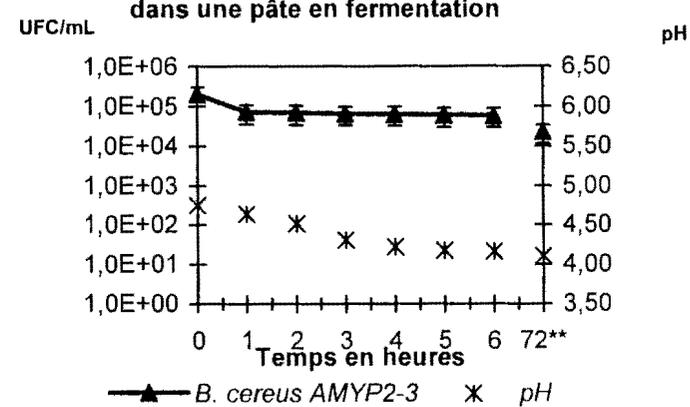
b- Evolution des populations de *B. cereus* ABP6-1 dans une pâte en fermentation



c- Evolution des populations de *B. cereus* BMYP7-3 dans une pâte en fermentation



d- Evolution des populations de *B. cereus* AMYP2-3 dans une pâte en fermentation



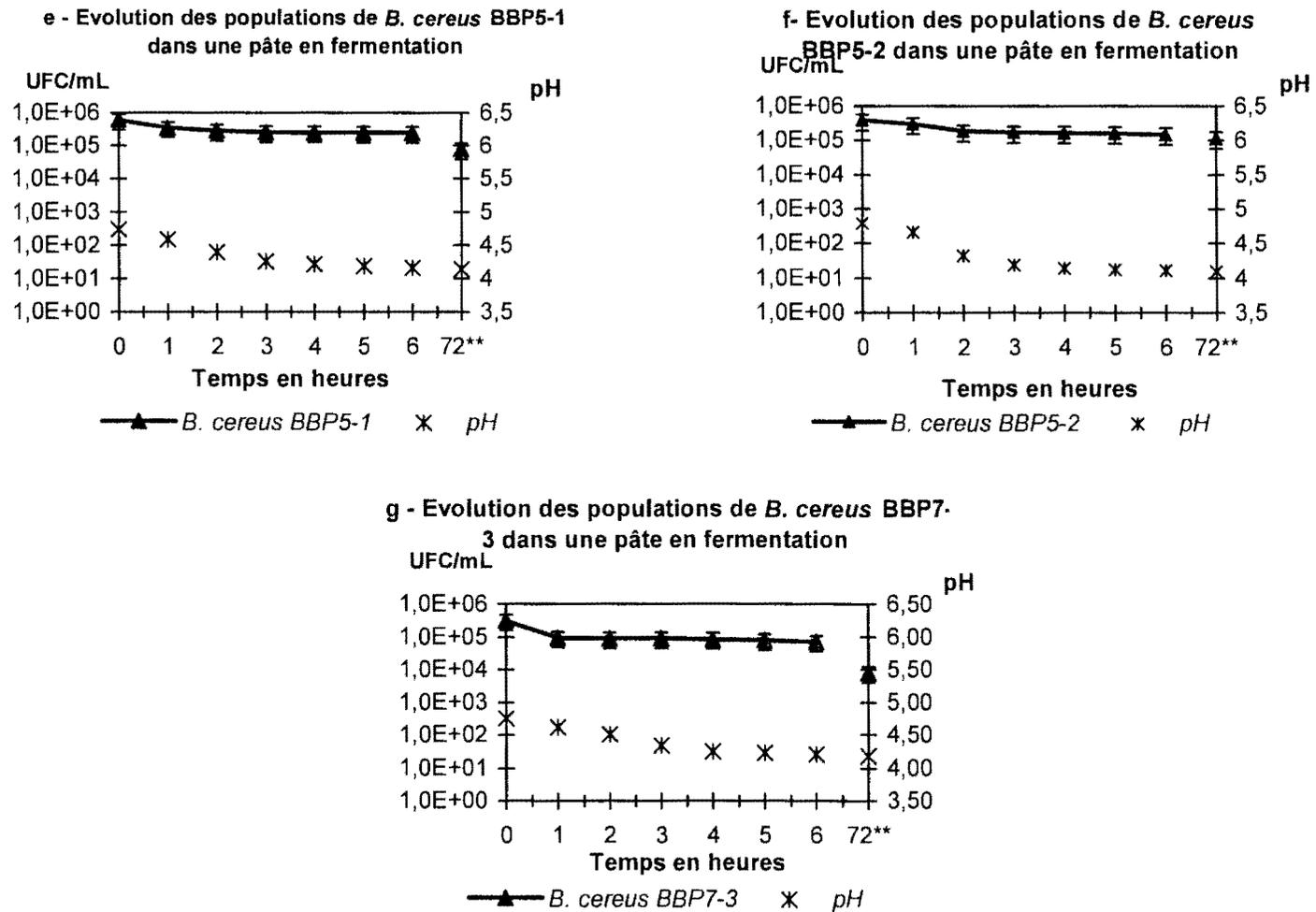


Figure 26 : Évolution de la population de différentes souches *B. cereus* isolées des ateliers de fabrication dans une pâte lors du processus de décantation

** incubation à 30°C jusqu'à 72h de l'échantillon traité à 80°C/10min puis refroid

II.1.2. – L'étude de la contamination par *Enterobacter sakazakii* et *Escherichia coli*

Pour le dénombrement sur milieu DCL, seules les colonies lactose + (rouges ou rosées) sont comptées après une incubation à 37°C pendant 24 heures et les résultats dans les figures suivantes correspondent aux moyennes de deux boîtes de Pétri ensemencées par la même dilution.

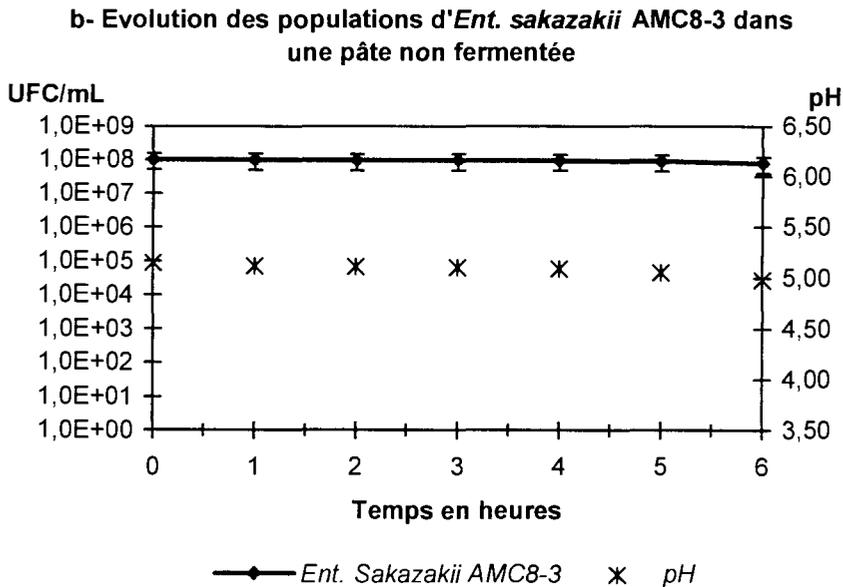
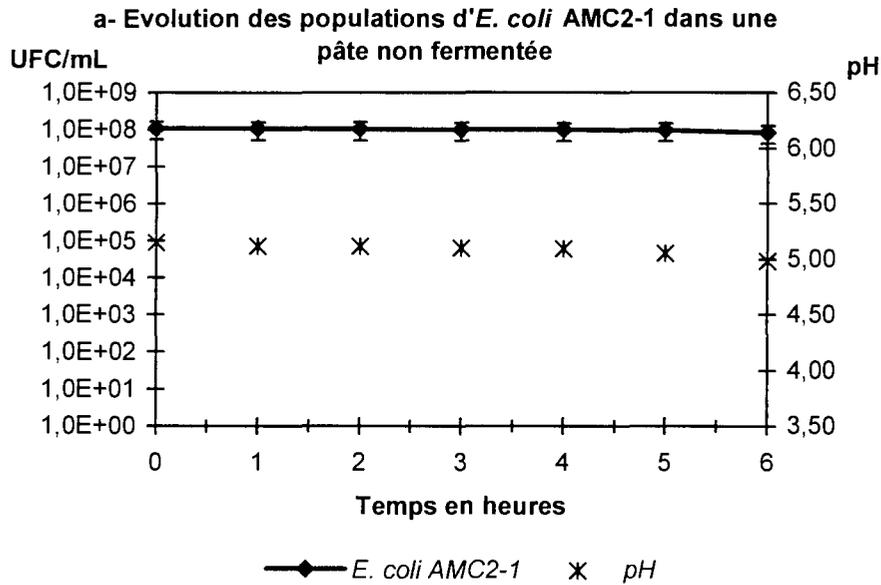


Figure 27 : Évolution de la population d'*Escherichia coli* AMC2-1, d'*Enterobacter sakazakii* AMC8-3 isolées d'ateliers de fabrication de Ouagadougou dans une pâte à pH 5 (contrôle négatif)

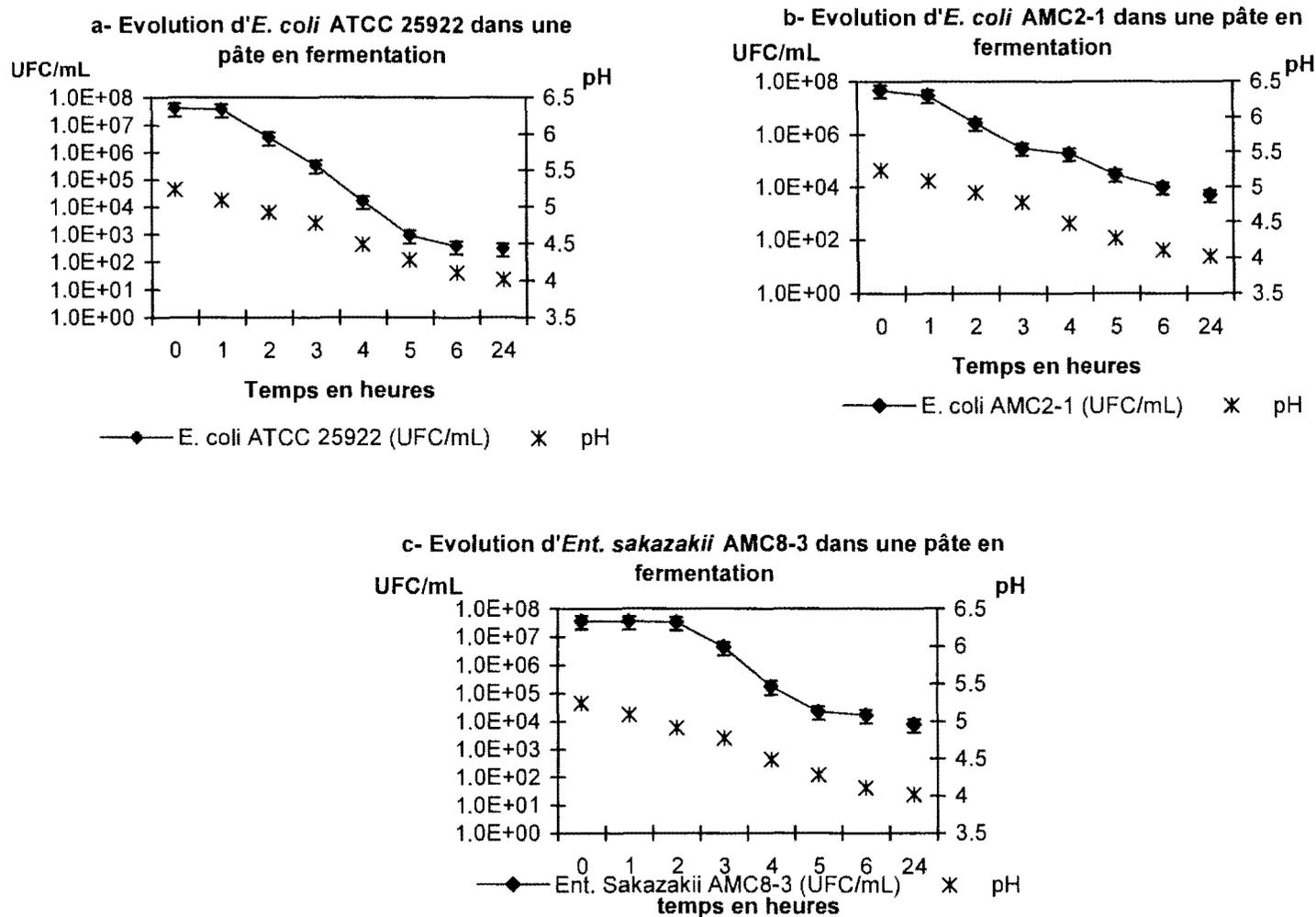


Figure 28 : Évolution de la population d'*Escherichia coli* AMC2-1, ATCC 25922 et d'*Enterobacter sakazakii* AMC8-3 dans une pâte en cours de fermentation

La population d'entérobactéries ne varie quasiment pas au cours des 6 heures d'incubation de la pâte non fermentée fabriquée à l'aide de mil pasteurisé (Figure 27). Cependant, durant la même période, elle décroît sensiblement lors de la fermentation de la pâte passant de $4,7 \times 10^7$ UFC/mL à $9,9 \times 10^3$ UFC/mL (*Escherichia coli* AMC2-1) (Figure 28b), de $3,8 \times 10^7$ UFC/mL à $1,7 \times 10^4$ UFC/mL (*Enterobacter sakazakii* AMC8-3) (Figure II-5c) et de $4,1 \times 10^7$ UFC/mL à $3,8 \times 10^2$ UFC/mL (*Escherichia coli* ATCC 25922) (Figure 28a).

Les résultats montrent que les souches testées dans la pâte non fermentée, se maintiennent à un niveau élevé alors que le pH est de 6 (Figure 27). Par contre, la fermentation lactique de la pâte, permet d'abaisser les niveaux de population de 3 à 4 \log_{10} voire de 5 \log_{10} en 6 heures (Figure 28). Cette relation entre l'acidification et l'inhibition du développement des entérobactéries a fait objet de plusieurs travaux. Ainsi, des résultats similaires ont été obtenus avec les jus de fruits (Molina *et al.*, 2005), avec le lait (Ogwaro *et al.*, 2002) et avec des céréales fermentées (Kunene *et al.*, 1999).

Après 24 heures de fermentation, il est intéressant de noter qu'en dépit du pH acide (pH = 4) les populations se maintiennent à des niveaux de $5,1 \times 10^3$ UFC/mL, $8,1 \times 10^3$ UFC/mL, $3,1 \times 10^2$ UFC/mL respectivement pour *Escherichia coli* AMC2-1 (Figure 28b), *Enterobacter sakazakii* AMC8-3 (Figure 28c) et *Escherichia coli* ATCC 25922 (Figure 28a). Ceci pourrait traduire une adaptation d'une fraction de la population à l'environnement acide, comportement déjà cité dans différents travaux réalisés avec différentes souches d'*E. coli* pathogènes (Cheng *et al.*, 2003 ; Ogwaro *et al.*, 2002 ; Ryuand and Beuchat, 1999).

II.1.3. – L'effet de la nisine sur Enterobacter sakazakii et d'Escherichia coli inoculés dans la pâte de mil en cours de fermentation

L'ajout de la nisine est réalisé aseptiquement après avoir mélangé l'inoculum au produit à tester. Les résultats sont donnés dans les figures 29.

Une décroissance de la population est observée pour chacune des trois espèces testées pendant la fermentation (Figure 29). Ainsi pour *Escherichia coli* AMC2-1 (Figure 29b) la concentration varie de $2,6 \times 10^8$ UFC/mL à $9,3 \times 10^4$ UFC/mL en 6

heures. La population d'*Escherichia coli* ATCC 25922, au cours de la même période, décroît de $2,5 \times 10^8$ UFC/mL à $1,9 \times 10^5$ UFC/mL (Figure 29a) et celle d'*Enterobacter sakazakii* AMC8-3 de $1,7 \times 10^8$ UFC/mL à $3,0 \times 10^4$ UFC/mL (Figure 29c). Cependant, alors que nous ne détectons pas de colonies après 24 heures pour les espèces *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Enterobacter sakazakii* AMC8-3, la population d'*Escherichia coli* AMC2-1 se stabilise à $8,4 \times 10^4$ UFC/mL.

La réduction est de l'ordre de 3 à 4 \log_{10} . elle ne diffère pas suffisamment de celle obtenue pour les souches testées en absence de nisine (Figure 28). Ainsi, hormis la non détection de colonies après 24 heures pour les souches d'*Escherichia coli* ATCC 25922 et *Enterobacter sakazakii* AMC8-3, on peut considérer que l'addition de nisine (Figure 29) ne présente pas un avantage qui en justifierait l'utilisation dans ce cas. Ces observations ne sont pas surprenantes, car des essais d'utilisation de cette molécule sur l'inhibition du développement des bactéries Gram- montrent l'inefficacité de la nisine vis-à-vis des microorganismes Gram- (Gänzle *et al.*, 1999 ; Henning *et al.*, 1986) sans ajout d'agents capables de fragiliser la paroi de ces bactéries (Boziaris and Adams, 1999 ; Gill and Holley, 2000 ; Helander and Mattila-Sandholm, 2000 ; Kuwano *et al.*, 2005).

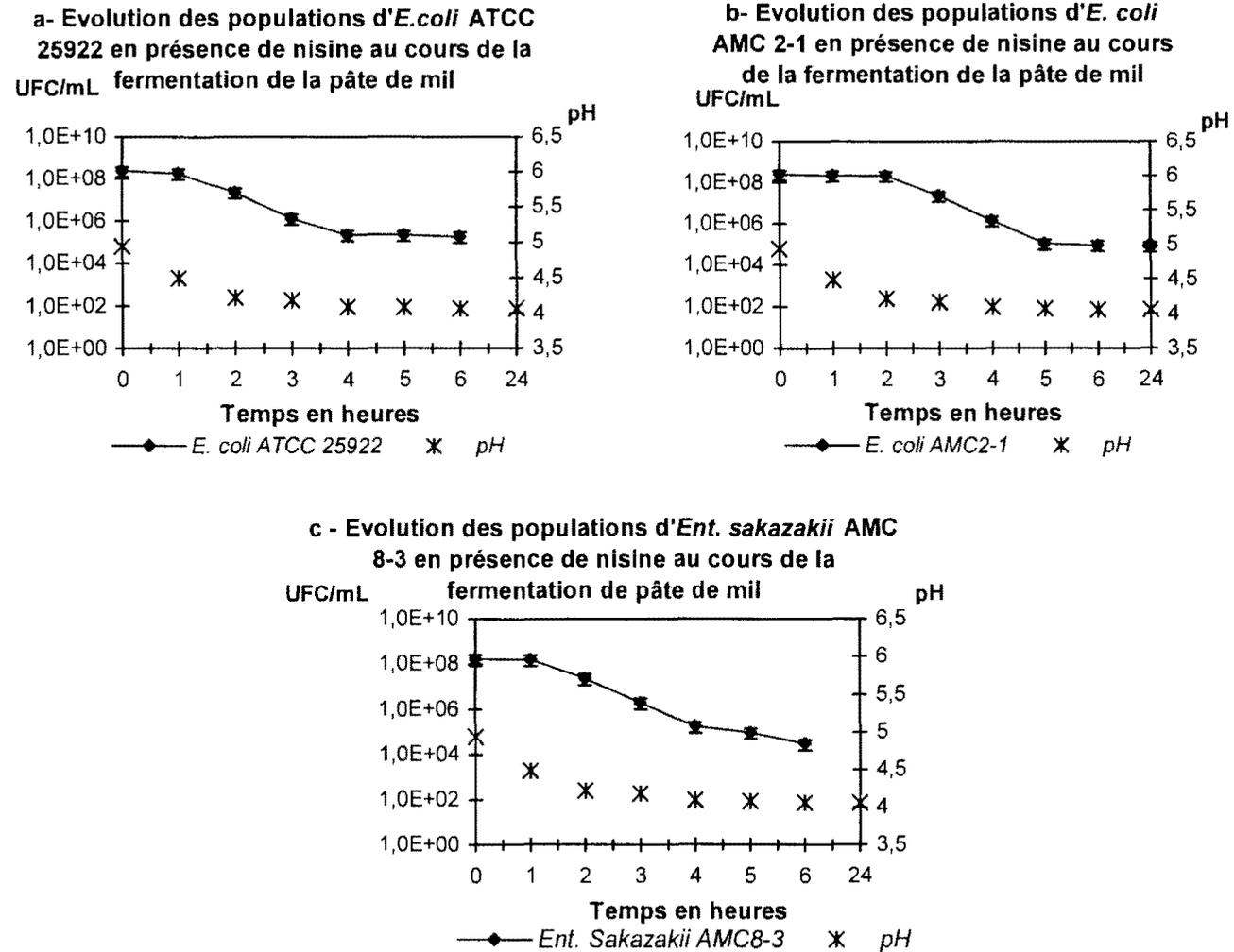


Figure 29 : Évolution de la population d'*Escherichia coli* AMC2-1, ATCC 25922 et d'*Enterobacter sakazakii* AMC8-3 dans une pâte additionnée de nisine durant le processus de décantation.

II.1.4. - Étude de la contamination par un mélange constitué de B. cereus, d'Ent. sakazakii et de E. coli

Les tests réalisés jusqu'à présent avec des souches pures inoculées individuellement ne nous permettent pas d'apprécier d'éventuelles interactions entre elles. Par ailleurs nous avons vu que des entérobactéries et des *Bacillus* pouvaient être isolés des mêmes pâtes. Ainsi nous avons réalisé un challenge test avec un mélange d'*Ent. sakazakii*, d'*E. coli* et de *B. cereus*.

Les figures 30 donnent les résultats du suivi du dénombrement du mélange de souches au cours de la fermentation de la pâte de mil. La population d'entérobactéries décroît sensiblement de $8,2 \times 10^7$ UFC/mL à $3,9 \times 10^3$ UFC/mL durant les 6 heures de la fermentation (Figure 30a). Cependant, la population de *B. cereus*, au cours de la même période, décroît de $5,2 \times 10^7$ UFC/mL à $7,8 \times 10^5$ UFC/mL (Figure 30b). Ainsi en 6 heures il y a une diminution de l'ordre de $4 \log_{10}$ et de $2 \log_{10}$ en UFC respectivement pour les entérobactéries et *B. cereus*. Comparativement aux résultats obtenus avec les inoculum en souche pure pour lesquelles nous obtenons des variations en UFC/mL de $4,7 \times 10^7$ à $9,9 \times 10^3$ pour *Escherichia coli* AMC2-1 (Figure 28b), $3,8 \times 10^7$ à $1,7 \times 10^4$ pour *Ent. sakazakii* AMC8-3 (Figure 28c) et $4,7 \times 10^5$ à $3,2 \times 10^5$ pour *B. cereus* BMYP 7-3 (Figure 26c), nous observons une légère augmentation de la population en germes, en particulier pour *B. cereus*. Ces résultats ne permettent pas de conclure en un gain notable et il est difficile, voire hasardeux, de tenter d'expliquer l'effet sur *B. cereus*. Tout au plus peut-on émettre l'hypothèse que certains métabolites produits par les entérobactéries pourraient avoir un léger effet inhibiteur sur *B. cereus*.

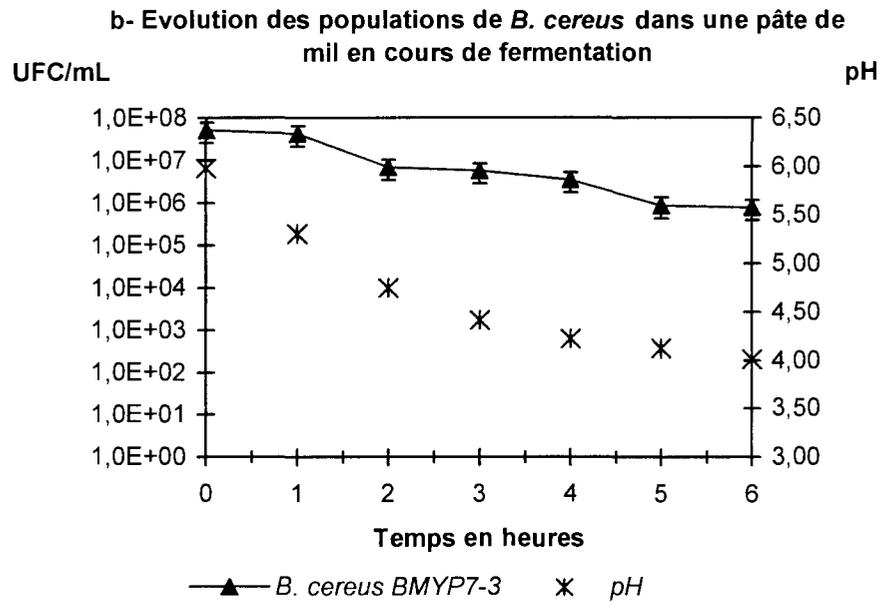
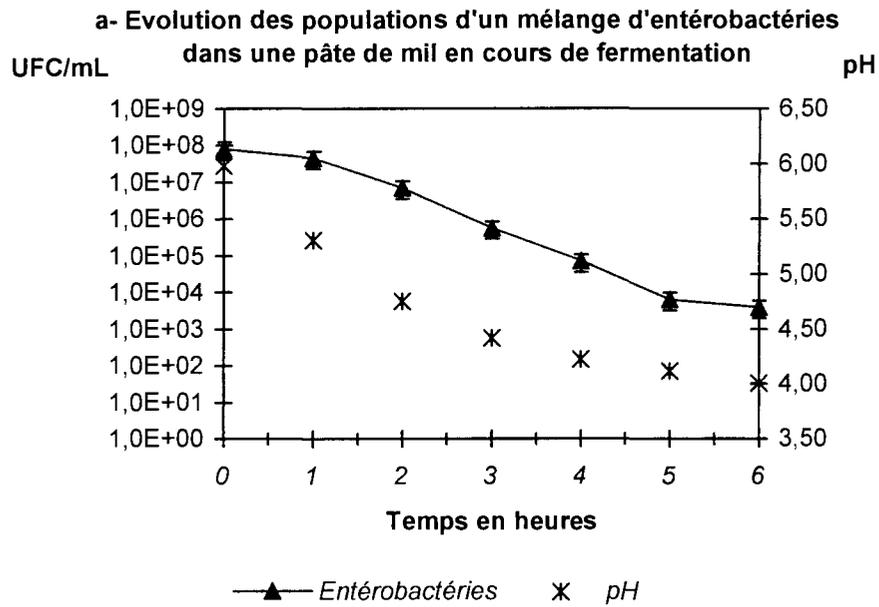


Figure 30 : Évolution de la population d'*Escherichia coli* AMC2-1, d'*Enterobacter sakazakii* AMC8-3 (entérobactéries) et *Bacillus cereus* BMYP7-3 pendant la fermentation de la pâte de mil (décantation)

II.2. - L'étude de la contamination de pâtes fermentées en présence ou en absence de nisine

Les résultats antérieurs nous montrent le comportement des souches testées inoculées dans une pâte non fermentée ou en cours de fermentation. Pour que l'étude soit complète, lors de cette nouvelle série de tests, nous avons inoculé une pâte en fin de fermentation à un pH voisin de 3,9. Les conditions de tests de croissance sont celles utilisées dans le cas de la pâte en cours de fermentation. Les mêmes souches ont été inoculées pour les entérobactéries. Seules les souches de *B. cereus* BMYP 7-3 et *B. cereus* ATCC 9139 ont été retenues pour les bactéries Gram+

II.2.1. – La contamination par *B. cereus*

II.2.1.1. – L'évaluation du comportement de *B. cereus* inoculé dans une pâte fermentée

Les niveaux moyens de populations en début d'essai sont de $3,4 \times 10^5$ UFC/mL (*B. cereus* BMYP 7-3) et de $3,1 \times 10^5$ UFC/mL (*B. cereus* ATCC 9139). Après six heures de fermentation on peut observer que le niveau de la population ne varie pas en dépit du pH acide du milieu (Figure 31).

Les niveaux de population après chauffage à 80°C/10min restent relativement élevés. On observe une faible différence existant entre les populations dénombrées juste après le traitement thermique à 80°C pour détruire les formes végétatives d'une part ($3,3 \times 10^3$ UFC/mL pour *B. cereus* BMYP 7-3 ; $2,4 \times 10^3$ UFC/mL pour *B. cereus* ATCC 9139) et après 72 heures d'incubation qui s'en suit d'autre part ($5,8 \times 10^3$ UFC/mL, $4,1 \times 10^3$ UFC/mL respectivement pour les essais avec *B. cereus* BMYP 7-3 et *B. cereus* ATCC 9139).

La fermentation lactique de la pâte de mil, en abaissant le pH ~ 3,9, n'est pas suffisante à elle seule pour obtenir un produit exempt de *B. cereus*. Les souches testées présentent une capacité d'adaptation à l'acidité du milieu. Elles le manifestent par la sporulation. Dans ces conditions, un traitement thermique, s'il n'est pas suffisant, permettrait l'ingestion massive de spores viables et être cause de TIAC dans le cas où ces spores seraient capables de germer et se multiplier dans le tractus gastro-intestinal.

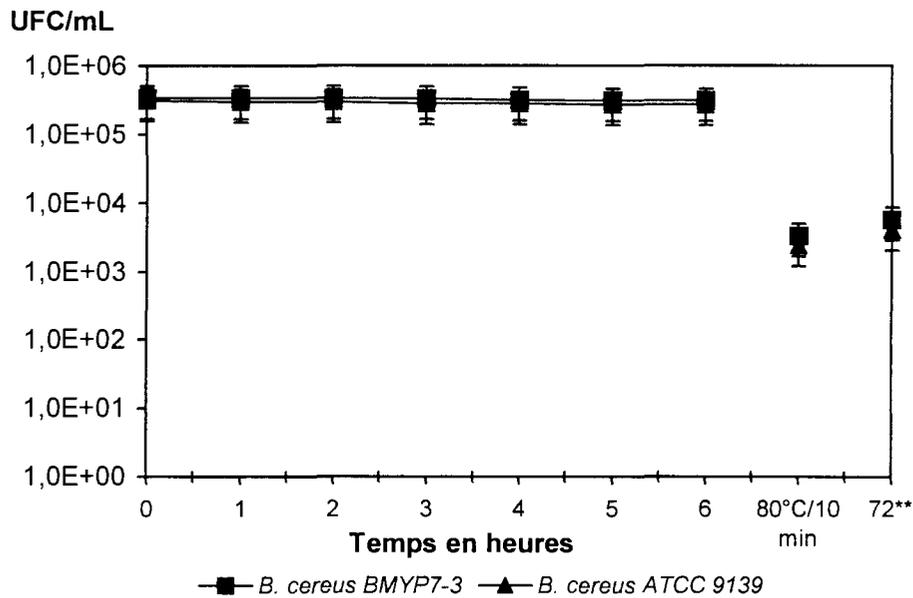


Figure 31 : Évolution de la population de *B. cereus* ATCC 9139 et *B. cereus* BMYP7-3 dans une pâte fermentée de mil à pH 3,95

II.2.1.2. – L'évaluation de l'effet de la fermentation sur la sporulation des espèces de *B. cereus* inoculées dans une pâte fermentée.

Les tests précédents ont été réalisés en dénombrant sans distinction les formes végétatives et sporulées. Cependant, en fin de test, un chauffage à 80°C pendant 10 min ne laisse dans le milieu que les spores bactériennes viables. Ce dénombrement réalisé après le traitement, montre que le barème température/temps appliqué n'est pas adéquat.

Afin de mieux connaître la cinétique de destruction des spores dans la matrice alimentaire étudiée, nous avons évalué l'effet de la durée d'un traitement thermique de 80°C appliqué à la pâte fermentée inoculée avec les souches tests. La pâte fermentée inoculée est distribuée dans des tubes à essai stériles à raison de 1 mL/tube. L'ensemble est placé dans un bain-marie maintenu à 80°C et chaque 10 minutes, un tube est prélevé, mélangé à 9 mL d'eau physiologique stérile, agité au vortex et 0,1 mL est étalé sur milieu MYP (2boîtes de Pétri/prélèvement). Les résultats sont présentés dans la figure 32.

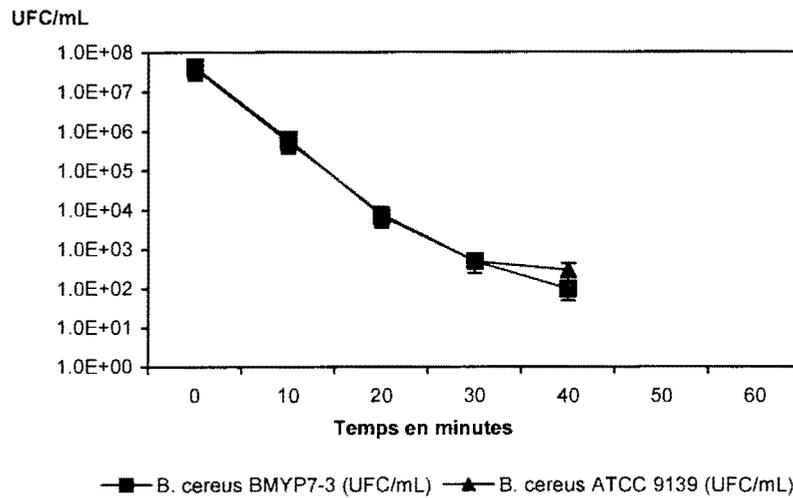


Figure 32 : Cinétique de destruction des spores de *B. cereus* inoculé dans la pâte fermentée

La cinétique de réduction de la concentration en spores nous a permis d'évaluer le temps de réduction décimale D (qui est le temps nécessaire pour réduire de 1 log₁₀ la population microbienne) de chacune des souches en utilisant la présente équation :

$$\text{Log } [N/N_0] = -t/D$$

(Andersson *et al.*, 1995 ; Gaillard *et al.*, 1998b ; Guiraud, 1998)

N population microbienne à l'instant t
 N₀ population microbienne initiale
 D (minutes)

Dans ces conditions, nous obtenons des valeurs de D voisines de 5,6 minutes (± 0,35 pour *B. cereus* BMYP 7-3 ; ±0,33 pour *B. cereus* ATCC 9139). Comparativement aux valeurs de D obtenu expérimentalement dans le riz (Sarrias *et al.*, 2002), celles déterminées dans nos conditions sont voisines de celles mesurées pour les souches de *B. cereus*. En effet ces auteurs ont montré une très grande variation de la valeur de D allant de 0,43 à 23,26 minutes en fonction de la température appliquée. Cette expérience nous indique clairement qu'il faut appliquer une cuisson d'une durée de 30 min à 80°C au minimum pour voir le taux de spores réduit à des niveaux compris entre 10² à 10³/mL.

II.2.2. – L'effet de la nisine sur *B. cereus* inoculé dans une pâte fermentée

Les 6 premières heures d'incubation dans la matrice à pH 4 ont conduit à une forte diminution de la population des souches testées contrairement aux résultats en absence de nisine. Les niveaux de populations sont initialement de $8,3 \times 10^6$ UFC/mL et $8,6 \times 10^6$ UFC/mL respectivement pour *B. cereus* BMYP7-3 et *B. cereus* ATCC 9139. A 6 heures, nous avons compté $2,7 \times 10^2$ UFC/mL pour chacune des souches, soit une chute de 4 \log_{10} . A l'opposé, durant la même période nous avons constaté un maintien de la population en absence de nisine. Alors que le traitement thermique de 80°C/10min suivi du séjour de 72 heures à 30°C n'entraîne pas de changements notables quand il n'y a pas d'ajout de nisine. Nous observons, en présence de nisine, que les populations diminuent de $3,8 \times 10^2$ à $1,1 \times 10^1$ UFC/mL pour *B. cereus* BMYP7-3 et de $1,7 \times 10^2$ à $1,0 \times 10^1$ UFC/mL pour *B. cereus* ATCC 9139. Malgré le chauffage, l'activité de la nisine persiste car cette molécule est thermostable (Henning *et al.*, 1986), par ailleurs le chauffage pourrait induire une fragilisation de la paroi cellulaire, favorisant ainsi l'action de cette bactériocine. L'action de la nisine sur ces bactéries Gram+ est constatée dans de nombreuses recherches (Chung and Hancock, 2000 ; Jamuna *et al.*, 2005 ; Kuwano *et al.*, 2005 ; Rajkovic *et al.*, 2005) et se confirme dans nos conditions expérimentales.

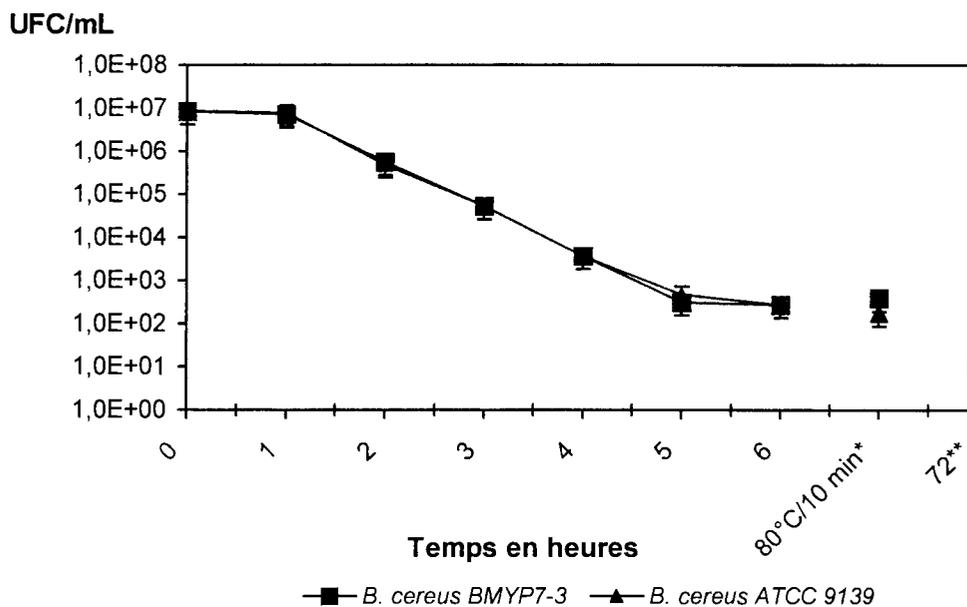


Figure 33 : Évolution de la population de *B. cereus* ATCC 9139 et *B. cereus* BMYP7-3 dans une pâte fermentée à pH 4,01 en présence de nisine (0,01mg/ml)

II.2.3. – Le mélange de population d'entérobactéries (*Escherichia coli* AMC 2-1, *Enterobacter sakazakii* AMC 8-3) et de *Bacillus cereus* (BMYP7-3) dans une pâte de mil fermentée

Similairement aux essais antérieurs nous avons réalisé un test avec un mélange de souches, à savoir : *Escherichia coli* AMC2-1, *Enterobacter sakazakii* AMC8-3 et *B. cereus* BMYP7-3. La pâte utilisée est acide, pH = 4±0,2. Les dénombrements sont réalisés respectivement sur milieu MYP pour les *Bacillus* et sur milieu DCL pour les entérobactéries. La figure 34 rend compte des résultats d'un essai de 6 heures.

Les populations d'entérobactéries décroissent sensiblement passant initialement de $6,4 \times 10^7$ UFC/mL à $1,5 \times 10^3$ UFC/mL après 6 heures. A contrario, le niveau de population de *B. cereus* reste stable ne présentant pas la légère diminution observée lors du test réalisé avec la pâte en cours de fermentation. Nous n'observons pas d'interactions dues à la présence des différentes souches bactériennes.

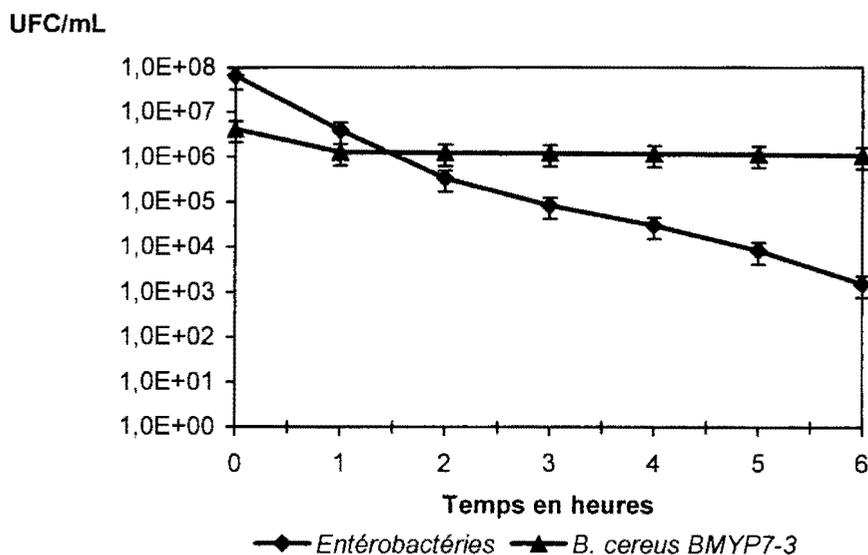


Figure34 : Evolution des populations d'entérobactéries (*Escherichia coli* AMC 2-1, *Enterobacter sakazakii* AMC 8-3) et de *Bacillus cereus* BMYP7-3 inoculées simultanément dans une pâte de mil fermentée à pH 4.

III - L'étude de la contamination post-cuisson des bouillies fermentées en présence ou en absence de nisine

Ici, nous étudions le cas d'une contamination qui peut se produire après dans les pâtes fermentées cuites avant consommation. Une fois cuite, la bouillie peut ne pas être consommée immédiatement et il existe donc un danger de re-contamination qu'il ne faut pas négliger. A cet effet, une contamination massive est donc réalisée après la cuisson et le refroidissement de la bouillie. Nous avons vu que la cuisson était un moyen efficace pour réduire le danger de contamination par des germes pathogènes et que pour les bactéries sporulées comme *B. cereus* il fallait veiller à appliquer un barème de cuisson permettant de réduire significativement le nombre de spores bactériennes. Pour ce dernier point, les dénombrements effectués directement sur des échantillons de bouillies provenant des ateliers traditionnels de production nous indiquent que les modalités traditionnelles de cuisson sont suffisantes pour assurer une qualité hygiénique optimale aux bouillies. Plus que la fermentation, la cuisson s'avère donc être une étape clef, bien que n'éliminant pas le danger de la présence de cereulide, cela ne remet pas en cause le rôle primordial de la fermentation mais le relativise quand on adopte une démarche qui prend en compte l'ensemble des germes potentiellement pathogènes.

III.1. - L'évaluation de la recontamination des bouillies par des souches de *B. cereus*

Les échantillons de pâte fermentée et de bouillie utilisés lors des tests de croissance ont un pH acide ($\approx 3,9$). L'inoculation a été réalisée, pour chacune des souches de *Bacillus* dans de la bouillie cuite (95°C/10 min) et refroidie. Les populations de spores bactériennes ont été dénombrées après à un traitement thermique de 80°C/10min appliquée à 1 mL (Figure 35) d'échantillon prélevé en fin de fermentation (6h) et refroidi. La capacité de germination des spores et le développement des germes issus de ces spores. Après ce traitement, les populations ont été mesurées par dénombrement à 30°C jusqu'à 72 heures (après la cuisson) (Figure 35).

Les tests de croissance réalisés sur la bouillie cuite et refroidie ont entraîné une décroissance des niveaux de populations des deux souches de *B. cereus* avec un effet plus important pour la souche ATCC 9139 (Figure 35). Durant les six premières heures, nous observons une diminution de $5,8 \times 10^7$ UFC/mL à $7,6 \times 10^6$ UFC/mL pour *B.*

B. cereus BMYP 7-3, soit une forte baisse dès la première heure suivi d'une neutralisation autour de cette valeur. Pour *B. cereus* ATCC 9139 nous observons une baisse beaucoup plus importante à partir de la troisième heure de $9,2 \times 10^6$ UFC/mL à $1,4 \times 10^5$ UFC/mL. Nous obtenons aussi, une population élevée en spores. Ces spores n'entraînent pas un niveau de contamination élevé par la suite.

Bien que la baisse de la population soit plus importante dans la bouillie par rapport à la pâte fermentée inoculée avant cuisson, il faut noter que le risque de recontamination par *B. cereus* est bien à prendre en compte, surtout si le nombre de spores est élevé. Il est intéressant aussi de constater que la souche sauvage (BMYP 7-3), dans le milieu, se comporte différemment de la souche de collection (ATCC 9139).

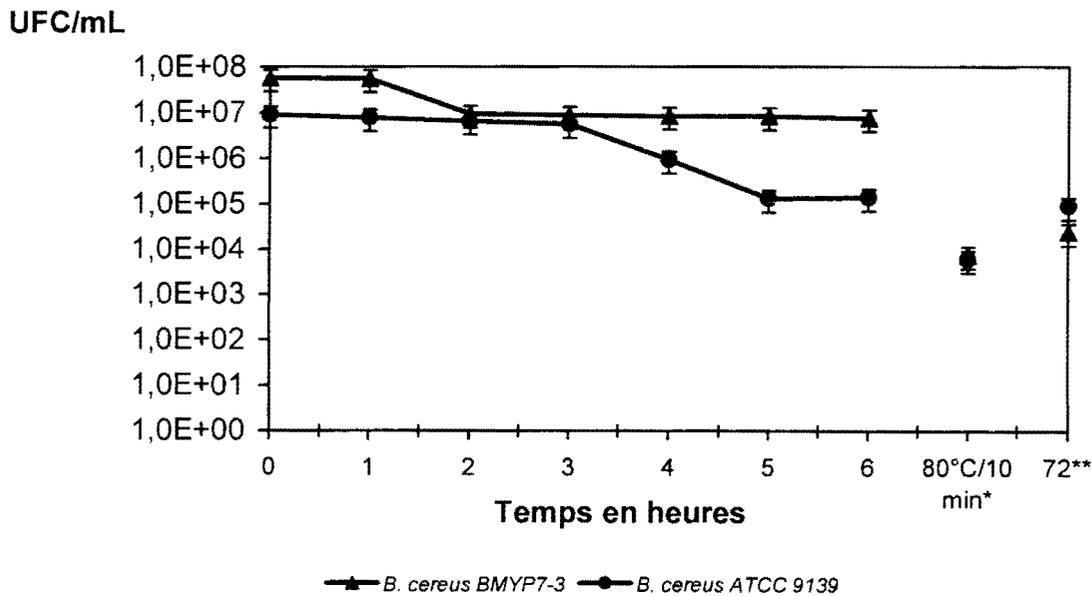


Figure 35 : Evolution des populations de *Bacillus cereus* BMYP 7-3 & ATCC 9139 dans une bouillie (pH 3,98) cuite à 95°C/10min puis refroidie

III.2. - L'évaluation de la recontamination des bouillies par des souches de *B. cereus* en présence de nisine

Les résultats présentés dans la Figure 36 ont été obtenus dans les mêmes conditions expérimentales que celles décrites précédemment (Figure 35). Nous avons complété 9 mL de mélange à l'aide de 1mL de nisine à 0,1 mg/mL de concentration pour obtenir une concentration finale en nisine de 0,01 mg/mL dans chacun des tubes.

Un effet notable de la nisine est constaté avec une réduction sensible du niveau de la population au cours du temps. Une réduction de $5,0 \times 10^7$ UFC/mL à $1,2 \times 10^4$ UFC/mL

pour *B. cereus* BMYP7-3 et de $8,1 \times 10^6$ UFC/mL à $7,8 \times 10^3$ UFC/mL pour *B. cereus* ATCC 9139 est constatée en 6 heures. Mais l'action de la nisine sur ces bactéries semblerait légèrement moins efficace que dans la pâte fermentée (Figure 32). S'il fallait vouloir expliquer ce moindre effet, nous pourrions émettre l'hypothèse que les modifications de texture de la matrice lors de la cuisson pourraient réduire l'efficacité de la nisine, c'est une piste qu'il conviendrait d'explorer par la suite (Aasen *et al.*, 2003).

L'ajout avant cuisson (Figure 32) ou après (Figure 36) de la nisine dans le produit possède un effet identique sur la population issue des spores car une légère baisse de la population est aussi constatée dans le cas d'une bouillie chauffée à 80°C/10min (*) ($4,7 \times 10^3$ UFC/mL *B. cereus* BMYP7-3 ; $4,1 \times 10^3$ UFC/mL *B. cereus* ATCC 9139) suivi d'une incubation de 72 heures à 30°C (**) ($1,1 \times 10^3$ UFC/mL *B. cereus* BMYP7-3 ; $3,6 \times 10^2$ UFC/mL *B. cereus* ATCC 9139).

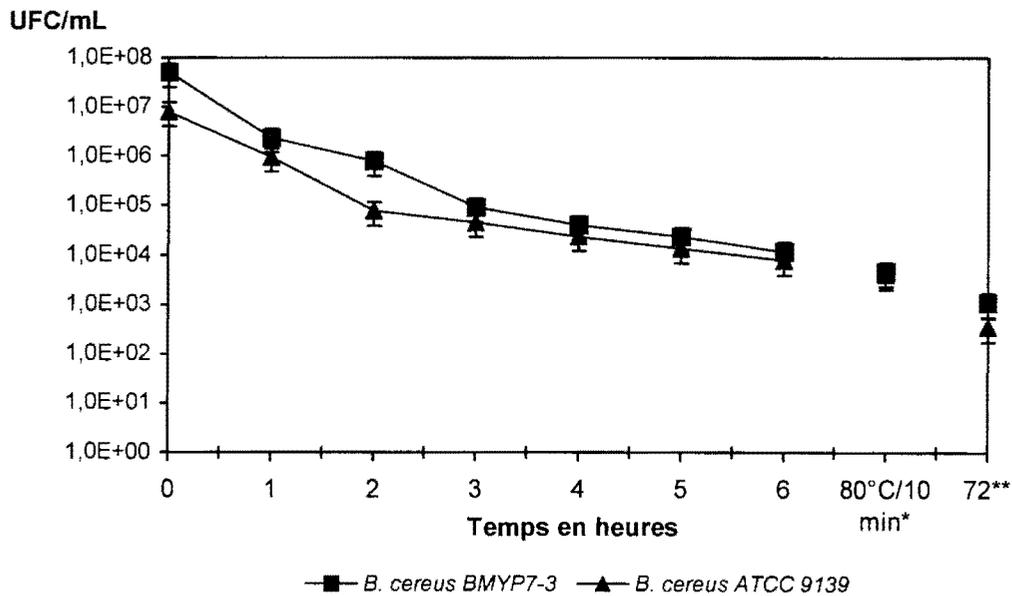


Figure 36 : Évolution des populations de *Bacillus cereus* BMYP 7-3 & ATCC 9139 dans une bouillie (pH $4 \pm 0,2$) cuite à 95°C/10min puis refroidie avec un ajout de nisine

III.3. - L'évaluation de la récontamination des bouillies par des souches d'*Escherichia coli* et d'*Enterobacter sakazakii*

La recontamination massive de la bouillie cuite puis refroidie montre, pour *E. coli* AMC 2-1, que la population a baissé de $8,4 \times 10^7$ UFC/mL à $3,8 \times 10^3$ UFC/mL après 6 heures (Figure 37a) pour se stabiliser après 24 heures à $3,2 \times 10^3$ UFC/mL (données non montrées). Pour *E. coli* ATCC 25922 un résultat similaire est observé durant les six premières heures car la population décroît de $1,9 \times 10^8$ UFC/mL à $4,0 \times 10^3$ UFC/mL (Figure 37a). Après 24 heures dans ces conditions aucun germe n'a été détecté (données non montrées). La souche *E. coli* AMC 2-1 est une souche sauvage isolée des ateliers de fabrication, elle possède sans doute des capacités d'adaptation ou de résistance au stress acide différent de celles observées pour les souches de collection.

Le constat est le même avec les souches d'*Enterobacter sakazakii* (Figure 37b). Les niveaux de populations baissent de $2,0 \times 10^8$ UFC/mL à $3,5 \times 10^3$ UFC/mL (*Ent. sakazakii* AMC 8-3) et de $9,6 \times 10^7$ UFC/mL à $3,2 \times 10^3$ UFC/mL (*Ent. sakazakii* CIP 103183 T) après 6 heures pour atteindre des niveaux de population non détectables après 24 heures.

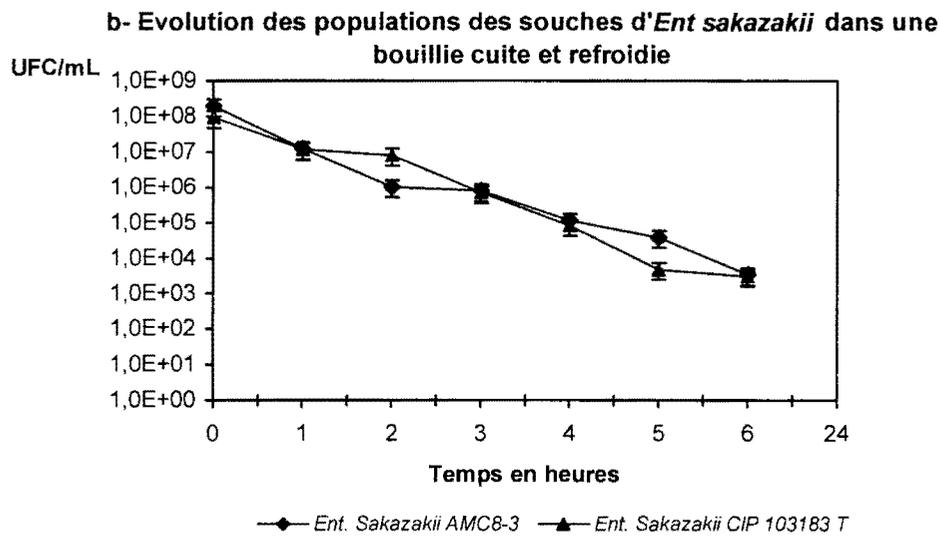
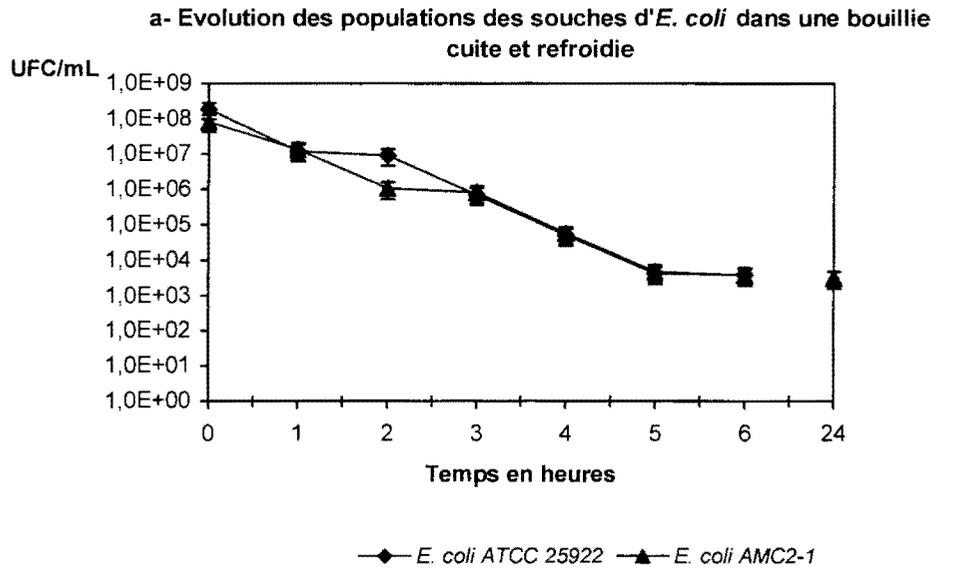


Figure 37 : Évolution des populations d'*Escherichia coli* (AMC 2-1 & ATCC 25922) et d'*Enterobacter sakazakii* (AMC 8-3 & CIP 103183 T) dans une bouillie (pH 4,10) cuite à 95°C/10min puis refroidie

III.4. - L'évaluation de la récontamination des bouillies par des souches d'*Escherichia coli* et d'*Enterobacter sakazakii* en présence de nisine

La nisine a été ajoutée après refroidissement et l'inoculation de chacune des souches testées. Les résultats sont montrés dans la figure figure 38.

Pour la souche *E. coli* AMC 2-1, les populations baissent de $3,0 \times 10^7$ UFC/mL à $8,8 \times 10^5$ UFC/mL en 6 heures pour se stabiliser à $3,5 \times 10^5$ UFC/mL après 24 heures. Au cours de la même période, la population de la souche d'*E. coli* ATCC 25922 a baissé de $1,3 \times 10^7$ UFC/mL à $5,0 \times 10^3$ UFC/mL pour ne plus être détectée dans le milieu après 24 heures (Figure 38a).

Les populations d'*Enterobacter sakazakii* évoluent dans le même sens. Pour la souche AMC8-3 isolée des ateliers de fabrication, la population décroît de $5,3 \times 10^7$ à $3,5 \times 10^3$ UFC/mL en 6 heures et celle de la souche de collection CIP 103183T décroît de $6,1 \times 10^7$ à $5,2 \times 10^3$ UFC/mL. Dans les deux cas, aucun germe n'est détecté après 24 heures (Figure 38b).

L'ajout de nisine n'apporte pas d'amélioration. Dans cette situation, seule la fermentation protège le produit d'éventuelles post-contaminations après cuisson. Cependant, cet effet n'est immédiat. La consommation immédiate d'un produit cuit, refroidi, fortement contaminé présente un risque pour la santé du consommateur car il faut attendre plusieurs heures pour que l'effet de la fermentation une baisse suffisante des niveaux de contamination pour atteindre des valeurs suffisamment faibles ne pas craindre de toxi-infections.

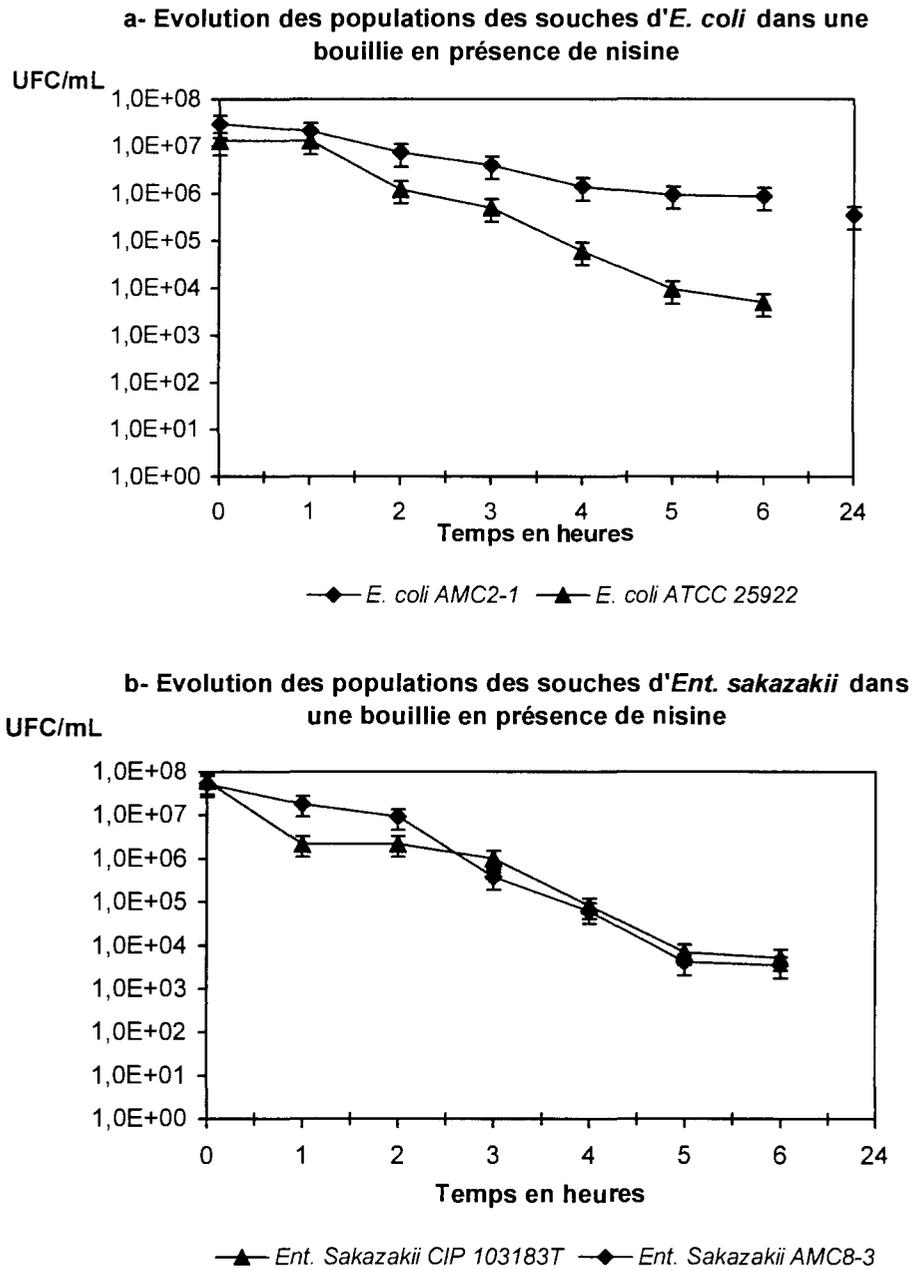


Figure 38 : Évolution des populations d'*Escherichia coli* (AMC 2-1 & ATCC 25922) et d'*Enterobacter sakazakii* (AMC 8-3 & CIP 103183 T) dans une bouillie (pH 4) cuite à 95°C/10min puis refroidie avec ajout de nisine

III.5. - L'étude de la récontamination des bouillies par un mélange d'entérobactéries (*Escherichia coli* AMC 2-1, *Enterobacter sakazakii* AMC 8-3) et de *Bacillus cereus* (BMYP7-3) en présence de nisine

1mL de nisine (0,1mL/mg) est mélangé à 9mL de bouillie contaminée massivement par un mélange d'entérobactéries (*E. coli* AMC2-1 et *Ent. sakazakii* AMC8-3) et de *B. cereus* BMYP7-3. Les dénombrements ont été réalisés sur le milieu DCL (entérobactéries) et sur le milieu MYP (*B. cereus*).

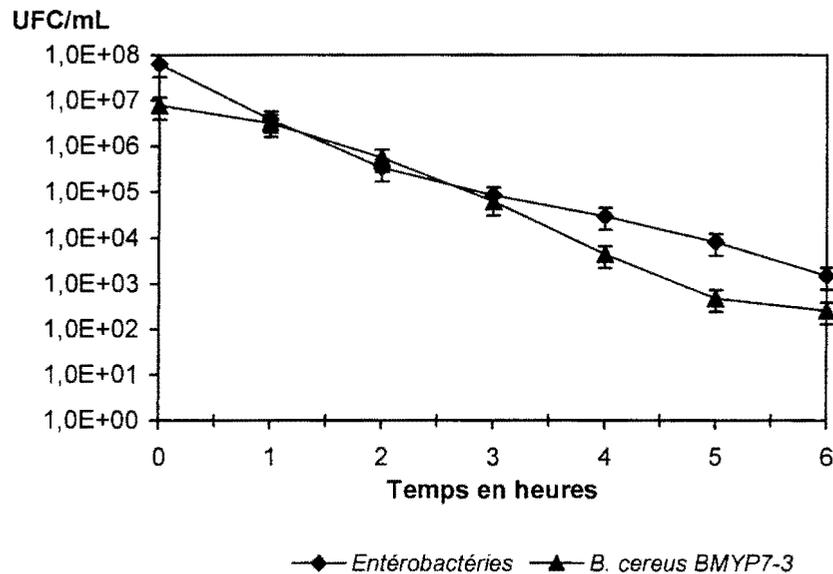


Figure 39 : Évolution de la population d'entérobactéries (*Escherichia coli* AMC 2-1, *Enterobacter sakazakii* AMC 8-3) et de *Bacillus cereus* BMYP7-3 dans une bouillie à pH 4,10 en présence de nisine

La population en entérobactéries décroît de $7,2 \times 10^7$ UFC/mL à $7,4 \times 10^2$ UFC/mL après 6 heures (Figure 39). Celles de *B. cereus*, sur la même durée, décroît de $7,8 \times 10^6$ UFC/mL à $2,6 \times 10^2$ UFC/mL. Ces résultats, au regard des expériences antérieures, peuvent être considérés comme une confirmation de ceux-ci. La seule conclusion que nous émettrons à ce niveau est que l'ajout de nisine s'avère être un élément de consolidation de la qualité sanitaire des bouillies par rapport au danger de contamination par *B. cereus* mais, aussi bien pour les entérobactéries que pour *B. cereus*, une période d'au moins trois heures est nécessaire pour atteindre un seuil de contamination qui soit inférieur à 10^5 UFC/mL après une contamination massive de 10^7 à 10^8 UFC/mL. On peut considérer que de tels niveaux de contaminations ne sont jamais atteints sur le terrain.

IV - Les essais d'utilisation de la PCR-DGGE pour l'appréciation de la diversité microbienne au cours des tests de croissance

Nous avons souhaité réaliser une analyse de la diversité microbienne par DGGE dans des échantillons issus de tests de croissance, afin d'apprécier si cette méthode pouvait permettre une détection des contaminants que nous avons inoculés. A cet effet nous avons extrait l'ADN des souches pures de *E. coli*, de *Ent. sakazakii* et de *B. cereus* et d'échantillons de pâtes ou de bouillies inoculées avec ces souches, puis vérifié l'extraction en gel d'agarose à 0,8% w/w (voir exemple Figure 40 pour *B. cereus*) puis amplifié cet ADN avec le couple d'amorces GC318f et 518r de la région V3 de l'ADNr. Après vérification de la vérification de l'efficacité de la PCR en gel d'agarose à 2% w/w (voir exemple pour *B. cereus* Figure 41), les amplicons ont été caractérisés par une électrophorèse en gradient de gel dénaturant (DGGE).

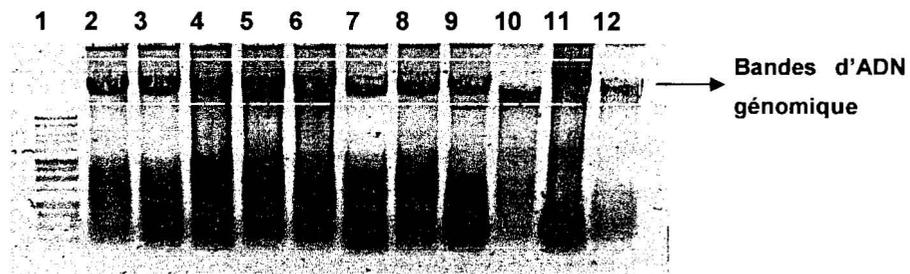


Figure 40 : Photo d'un gel d'agarose à 0,8% w/w pour vérifier l'extraction des ADN bactériens à partir de suspensions de différentes espèces pures de *B. cereus*.

Marqueur de taille 1Kb (1) ; *B. cereus* AMYP7-4 (2) ; *B. cereus* ABP6-1 (3) ; *B. cereus* BMYP7-4 (4) ; *B. cereus* AMYP2-3 (5) ; *B. cereus* BBP5-2 (6) ; *B. cereus* BBP7-3 (7) ; *B. cereus* AMYP7-4 (8) ; *B. cereus* CMYP2-1 (9) ; *B. cereus* BMYP7-1 (10) ; *B. cereus* BMYP7-10 (11) ; *B. cereus* ATCC 9139 (12)

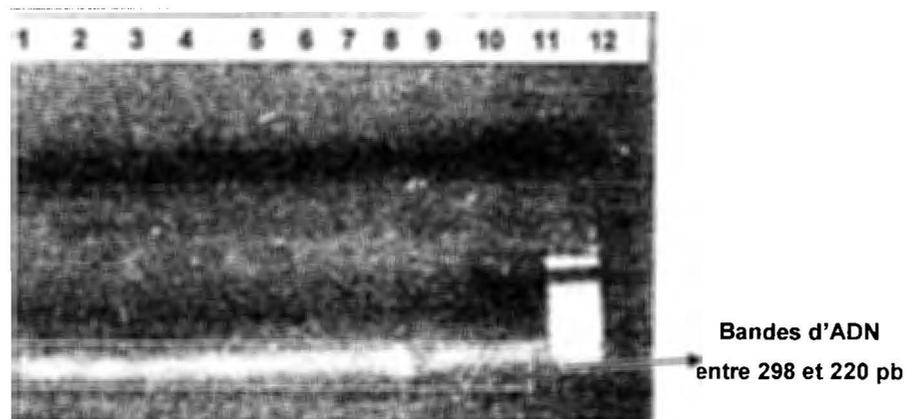


Figure 41 : Photo d'un gel d'agarose 2% w/w pour vérifier l'efficacité de la par PCR avec les amorces GC 318f et 518r des ADN bactériens extraits des souches pures de *B. cereus*.

Marqueur de taille 100 pb (11) ; *B. cereus* AMYP7-4 (1) ; *B. cereus* ABP6-1 (2) ; *B. cereus* BMYP7-4 (3) ; *B. cereus* AMYP2-3 (4) ; *B. cereus* BBP5-2 (5) ; *B. cereus* BBP7-3 (6) ; *B. cereus* AMYP7-4 (7) ; *B. cereus* CMYP2-1 (8) ; *B. cereus* BMYP7-1 (9) ; *B. cereus* BMYP7-10 (10) ; Blanc (eau pure) (12)

Les produits d'amplification des ADN extraits des souches pures ou d'échantillons ayant servis pour les tests de croissance ont été analysés par DGGE.

Chaque extrait d'ADN de souche pure amplifié donne des bandes d'intensité suffisante pour être vue après coloration au BET sous UV (Figure 42 & 43). Pour certaines souches pures (par exemple *Ent. sakazakii* CIP 103183T puits 3, 8, 13) (Figure 42) plusieurs bandes sont observées. La présence de plusieurs copies par génome de l'opéron *rrn* et la microhétérogénéité des gènes codants pour l'ARN16S peuvent expliquer la présence de plusieurs bandes pour une seule souche pure (Brüggemann *et al.*, 2000 ; Díez *et al.*, 2001 ; Farrelly *et al.*, 1995 ; Florez and Mayo, 2006 ; Kisand and Wikner, 2003), il se peut aussi que des produits d'amplification non spécifiques se soient formés dans nos conditions opératoires (Ercolini, 2004 ; Kisand and Wikner, 2003), cependant cette hypothèse est moins probable compte-tenu du fait que notre protocole appliqué à d'autres souches bactériennes donne qu'un seul amplicon.

Dans un écosystème donné, les communautés bactériennes sont constituées d'une multitude d'espèces appartenant à des espèces différentes. Cependant la PCR ne permet pas d'amplifier systématiquement l'ADN des espèces présentes en très faible quantité et ne révèle en général que celles qui sont dominantes ou sous-dominantes, ce qui introduit un biais supplémentaire dans l'appréciation de la diversité réelle. Néanmoins, l'inoculation massive des pâtes et bouillies sont des conditions favorables pour vérifier par PCR la présence des souches utilisées et nous pouvons ainsi détecter la présence des souches d'entérobactéries et de *B. cereus* (Figures 42 et 43). Par ailleurs, en raison probablement de la faible diversité microbienne dans les pâtes et bouillies fermentées que nous avons étudiées (Figures 42 et 43), nous pouvons détecter des traces d'ADN d'*E. coli* AMC2-1 (Figure 42) bien que la présence de cette souche n'a pas été détectée par les méthodes traditionnelles. Cependant ceci ne permet pas de renseigner sur la viabilité de l'espèce ainsi détectée, en fait pour que l'information soit complète il eut été préférable d'extraire les ARN et d'amplifier l'ARNr16S.

Ces expériences n'ont été réalisées qu'à titre exploratoire et mériteraient d'être reprises et approfondies. Il serait intéressant de coupler les tests de croissance avec un test moléculaire comme la DGGE ou toute autre méthode permettant de détecter les

pathogènes en dessous de leur seuil de détection par des méthodes culturales. Par ailleurs, il ne faut pas négliger que les conditions de transformation du mil en bouillie implique au moins une étape (fermentation) qui fait subir aux bactéries pathogènes un stress acide et, ormis celles qui sont acido-tolérantes dans la population, que certaines puissent être présentent à l'état viable mais non cultivable, dans ce cas les moyens de la bactériologie classique s'avèrent impuissants pour explorer aisément l'effet des procédés sur l'état de viabilité des cellules.

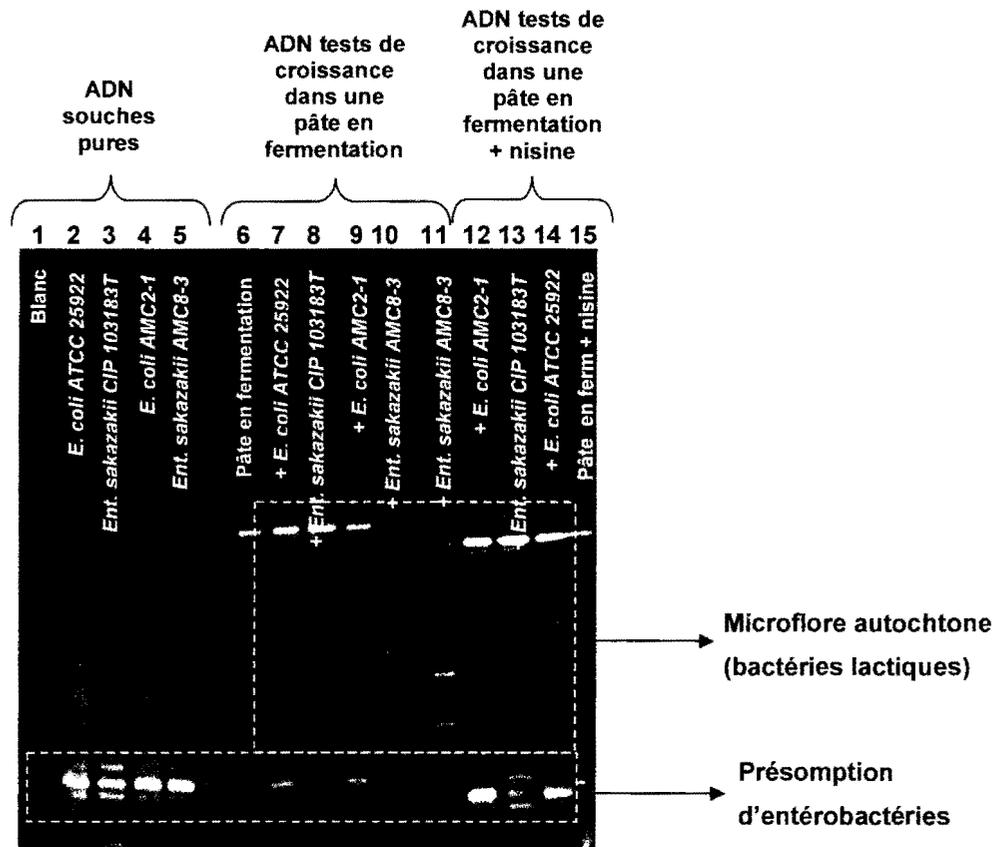


Figure 42 : Photos de gels de DGGE des souches d'entérobactéries isolées des ateliers ainsi que de souches pures d'*Escherichia coli* ATCC 25922 et d'*Enterobacter sakazakii* CIP 103183T inoculées (Puits 6 à 11) ou non (Puits 1 à 5) dans de la pâte en cours de fermentation en présence de nisine (Puits 12 à 15)

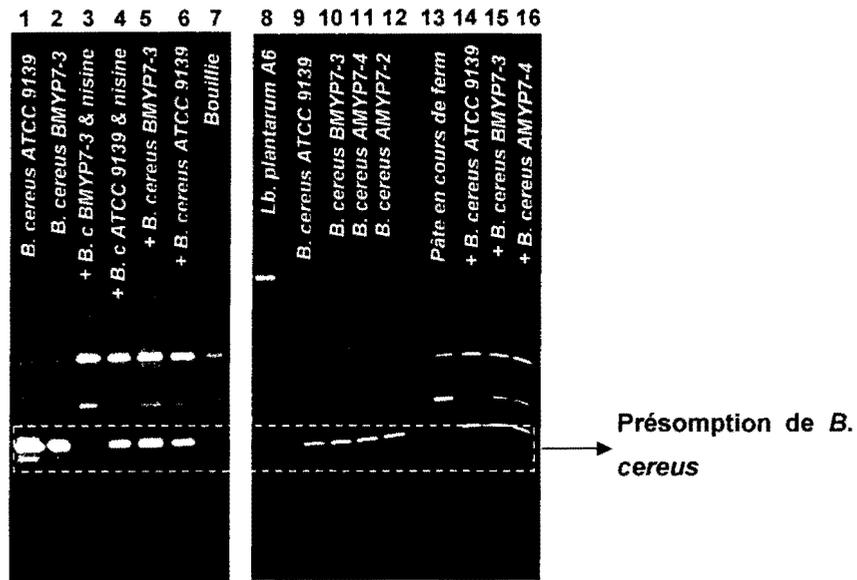


Figure 43 : Photos d'un gel de DGGE de *Lactobacillus plantarum* A6 (*Lb. plantarum* A6) (Puits 8) et de bouillie en absence (Puits 5 à 7) ou en présence de nisine (Puits 3 et 4), de pâte en cours de fermentation inoculée avec différentes souches de *B. cereus* (Puits 13 à 16) ou non par (Puits 1 et 2 ; 9 à 12)

Conclusion

Conclusion générale et perspectives

L'objectif principal de nos travaux s'inscrit dans une démarche de maîtrise de la qualité des produits céréaliers fermentés dans les pays du sud, en particulier les aliments de complément du jeune enfant. Les objectifs particuliers de nos travaux sont, d'une part d'apprécier la qualité hygiénique des bouillies fermentées produites dans les ateliers traditionnels, et d'autre part d'évaluer l'effet d'une contamination massive par des bactéries pathogènes en présence ou en l'absence d'une molécule antimicrobienne produite par les bactéries lactiques, à savoir la nisine.

Ainsi, dans un premier temps, nous avons évalué la qualité bactériologique des produits issus de différentes étapes de transformation dans 10 sites artisanaux à Ouagadougou. Cette démarche, qui ne prétend pas être exhaustive compte tenu de sa lourdeur et de la difficulté de travailler dans ce contexte, peut s'apparenter à celle suivie par Kunene *et al* (1999) sur les aliments de compléments fermentés à base de sorgho en Afrique du Sud. Cependant, les travaux de Kunene *et al* (1999) ne sont pas allés jusqu'à une identification aussi complète des germes à différentes étapes des procédés et ne se sont appuyés que sur des tests d'identification présomptifs à partir des milieux de culture sélectifs.

L'application de la méthodologie HACCP nous a permis d'identifier les différents points critiques (CCP). Pour terminer, nous avons étudié la résistance de ces produits à des contaminations par la mise en œuvre de tests de croissance en utilisant des souches de bactéries pathogènes de collection ou isolées dans les produits prélevés dans les 10 ateliers de notre étude. Ces souches sont connues pour être responsables de toxi-infections chez les jeunes enfants. Bien que classique, la méthode des tests de croissance n'a pas encore été appliquée pour évaluer les dangers de contamination des bouillies infantiles produites dans des pays en développement et africains en particulier, ceci constitue donc une des originalités de cette thèse. Jusqu'à présent les travaux publiés se sont appliqués à montrer l'occurrence de certains types de pathogènes sans toutefois adopter une approche d'évaluation du danger lié à leur développement et ce à certaines étapes des procédés de transformation. De même, le danger de re-contamination a été très peu étudié alors que dans les conditions qui prévalent dans de nombreux contextes africains, les aliments peuvent être conservés à

l'air libre sans précautions particulières pour être consommés à différents moments de la journée. De manière beaucoup plus générale, comme dans les pays industrialisés, l'étude du danger de recontamination des produits alimentaires est une voie d'investigation qui selon certains auteurs devrait être développée (Reij and Den Aantrekker, 2004).

Tous les échantillons d'aliments sont contaminés à des niveaux variables par les différentes souches appartenant aux grandes catégories recherchées. La fermentation lactique a un effet inhibiteur sur le développement des entérobactéries. Les bactéries sporulées, de par leur aptitude à la sporulation résistent mieux à l'environnement acide. Cependant, il a été mis en évidence des bactéries de la famille des entérobactéries capables de résister au stress acide. Le niveau de contamination est fonction de la matière première utilisée, des techniques et ustensiles utilisés, des étapes et de l'environnement de fabrication. Une source importante de contamination à ne pas négliger sont les post-contaminations surtout après l'étape de cuisson qui demeure la principale voie pour l'obtention de bouillies aptes à la consommation.

La première partie de nos travaux associée à nos observations de terrain nous permet de conclure que la simple mise en application des règles de bonnes pratiques d'hygiène serait à elle seule suffisante pour contribuer à améliorer la qualité sanitaire des bouillies. Outre une bonne hygiène personnelle des opérateurs et celle des ustensiles, il est une mesure qu'il serait important de recommander aux producteurs : l'utilisation de couvercles, car toutes les étapes sont réalisées à l'air libre, et le plus souvent dans la cour des ateliers familiaux. Les récipients sont donc susceptibles d'être en permanence contaminés par la poussière environnante et les insectes dont les mouches. Une autre mesure serait aussi de préconiser d'éviter la libre circulation des animaux domestiques et d'élevage comme les chiens et les poules, respectivement dans les sites de production et autour des récipients de fabrication. Toutes ces préconisations peuvent paraître triviales dans des pays industrialisés, mais dans des contextes de pauvreté et de faible niveau d'alphabétisation tels qu'ils peuvent être rencontrés en Afrique ou d'autres pays en développement, leur prise en compte doit passer par une éducation à l'hygiène des producteurs.

449 espèces de bactéries ont été isolées et caractérisées, cependant l'éventail des bactéries pathogènes ou potentiellement pathogènes rencontré est très limité, ceci est rassurant compte tenu des conditions d'élaboration de ces aliments et de leur usage en alimentation infantile, mais l'est moins quant à « la qualité » des pathogènes que nous avons pu identifier en relation avec les critères que nous attendons au sujet de la qualité d'aliments destinés aux jeunes enfants. Concernant les entérobactéries, les espèces *Kleb. pneumo ssp pneumoniae*, *E. coli* et *Ent. sakazakii* ont été rencontrées. Différentes espèces du genre *Staphylococcus* ont été isolées et aucune n'est prédominante. Pour les bacilles et coccobacilles à Gram négatif non entérobactérie, l'espèce *Chryseomonas luteola* est souvent rencontrée. Et enfin pour les bacilles et coccobacilles à Gram positif anaérobies, c'est l'espèce *Clostridium beijerinckii /butyricum* qui a été la plus caractérisée. Chez les *Bacillus*, mais aussi en règle générale par rapport à l'ensemble des souches isolées, *B. cereus* apparaît comme le contaminant majeur. Ceci est loin d'être surprenant si l'on tient compte des caractéristiques de l'aliment et de *B. cereus* mais pose un problème d'écologie microbienne intéressant en termes de diversité des espèces de *B. cereus* en relation avec leur virulence et leur pouvoir pathogène. A l'heure actuelle des travaux sont en cours de réalisation au sein du laboratoire pour étudier ces différents aspects en étudiant les souches qui ont été isolées lors des travaux présentés ici. Outre *B. cereus* dont nous venons de souligner l'intérêt, il convient aussi d'insister sur la présence d'*Ent. sakazakii*, qui est un pathogène capable de causer des méningites néo-natales et des bactériémies qui fait l'objet d'un intérêt croissant de la part de la communauté scientifique (Gurtler et al., 2005). Ce pathogène, dont nous rapportons pour la première fois l'occurrence dans des aliments traditionnels africains à base de céréales, est considéré comme émergent et a été fréquemment isolé de formulations sèches ou liquides lactées destinées aux jeunes enfants de pays industrialisés mais n'a malheureusement pas fait l'objet de recherches systématiques dans les pays en développement. Une publication récente rapporte que ce pathogène prolifère très bien à des températures ambiantes dans différentes formulations à base de farine de riz reconstituées avec différents liquides (jus de pomme, eau, lait) (Richards et al., 2005), les auteurs recommandent fortement de consommer immédiatement de tels aliments après leur préparation ou sinon de les jeter, recommandations qui vont dans le sens de celles que nous pourrions émettre sur la base de nos études. Certaines autres recommandations existent quant à la préparation de ce type d'aliments déshydratés

(Nazarowec-White and Farber, 1997), mais celles-ci sont peu transposables dans le contexte de notre étude excepté le fait que les produits doivent subir un traitement thermique adéquat, ainsi une cuisson adéquate paraît être un excellent garant pour se prémunir contre ce type de pathogène comme nous l'indiquent les dénombrements réalisés sur les échantillons prélevés dans les ateliers. Cependant un doute subsistait quant à l'effet de l'acidification lié à la fermentation, car les espèces d'*Ent. sakazakii* ont été signalées comme présentant une résistance particulièrement élevée aux bas pH suite à des tests réalisés à pH 3,5 (Gurtler *et al.*, 2005), ce qui accroît l'intérêt pour les tests de croissance que nous avons effectués.

La troisième partie de nos travaux a été initiée pour évaluer le danger de contamination lié aux coliformes (*E. coli* et *Ent. sakazakii*) et *B. cereus* lors du processus de fabrication des bouillies de pâtes de mil fermentées. La fermentation lactique (réduction du pH, production de molécules d'acides organiques) s'avère efficace pour réduire la concentration en espèces d'entérobactérie. En particulier on peut noter un effet bactéricide sur les espèces d'*Ent. sakazakii* inoculées dans des pâtes fermentées, contrairement aux craintes suscitées par les rapports précédents (Gurtler *et al.*, 2005). Cependant la cuisson de la pâte s'avère être efficace pour réduire considérablement le danger lié à des pathogènes. Par contre, la fermentation lactique ne constitue pas une barrière efficace contre la survie de *B. cereus* testées. Cette bactérie est présente sous sa forme sporulée et une cuisson mal maîtrisée ne diminue pas le risque de TIAC par ces germes. Pour ces souches, hormis les difficultés liées à leurs capacités à sporuler, celles liées à la thermorésistance de la cereulide non détruite au cours de la cuisson restent inquiétantes.

Ceci renforce l'intérêt de mieux connaître l'écologie des souches de *B. cereus* en relation avec leur diversité fonctionnelle vue sous l'angle de leur virulence. Malheureusement dans le cadre de cette thèse nous n'avons pas pu approfondir cet aspect, d'autant moins que nos tentatives d'utilisation des amorces et conditions données dans la littérature pour caractériser la virulence des souches par amplification PCR de leurs déterminants génétiques se sont avérées infructueuses. Néanmoins, le développement des méthodes moléculaires comme la DGGE peut offrir des perspectives d'étude des pathogènes dans ces aliments par une approche globale.

La recontamination de la bouillie cuite reste un risque pour la santé du jeune enfant. A contrario, une forte contamination de la pâte ayant achevée son processus de fermentation est moins risquée vue l'étape de cuisson à venir. L'utilisation de la nisine est un moyen permettant d'améliorer la qualité sanitaire des bouillies. Comme attendu, en dehors de mise en oeuvre de traitements de fragilisation de la paroi bactérienne, elle s'est avérée inefficace à l'encontre des entérobactéries. Par contre, son utilisation permet de réduire efficacement le taux de *B. cereus*.

Cette étude a montré qu'en dépit d'une étape de fermentation lactique, il existait un danger lié à la présence et la sporulation de bactéries pathogènes, plus particulièrement de *B. cereus*, dans les pâtes et bouillies fermentées à base de mil. Les produits traditionnels du Burkina Faso ont servi de modèle à cette étude, mais compte tenu de la similarité des nombreux procédés africains de transformation des céréales par voie humide, nous pouvons penser que les conclusions de nos travaux peuvent aussi s'étendre à d'autres aliments fermentés à base de céréales et contextes africains.

Afin de limiter les dangers décrits, plus que des mesures technologiques, un effort de sensibilisation aux bonnes pratiques d'hygiène en direction des producteurs traditionnels nous paraît être une démarche prioritaire à mettre en oeuvre. De surcroît, dans un procédé amélioré, en particulier dans le cadre d'un changement d'échelle de production qui dépasserait le stade artisanal, l'une des voies prometteuses pour réduire le danger lié à une contamination par des espèces de *B. cereus* serait d'ajouter un composé antimicrobien comme la nisine, d'utilisation très large pour différentes catégories d'aliments. Cette molécule étant thermostable, elle pourrait être ajoutée en fin d'étape de fermentation et avant cuisson, ce qui permettrait de cumuler les deux effets : destruction thermique par cuisson et inhibition par la nisine. Cependant, le tableau brossé dans le cadre de cette thèse ne devrait pas noircir la qualité intrinsèque de ces aliments produits dans des « conditions extrêmes » qui dans l'ensemble présentent un niveau de qualité hygiénique satisfaisant : la fermentation lactique, bien que n'étant pas la panacée universelle, demeure encore un moyen incontournable d'assurer la qualité hygiénique des aliments des populations les plus défavorisées.

*Références
Bibliographiques*

Références Bibliographiques

1. Aasen, I. M., Markussen, S., Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L. and Naterstad, K. (2003). Interactions of the bacteriocins sakacin P and nisin with food constituents. *International Journal of Food Microbiology* **87**, 35-43.
2. Abdulmawjood A, Bülte M, Cook N, Roth S, Schönenbrücher H, Hoorfar J (2003) Toward an international standard for PCR-based detection of *Escherichia coli* O157 Part 1. Assay development and multi-center validation. *Journal of Microbiological Methods* **55**, 775- 786.
3. Abee, T., Krockel, L. and Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology* **28**, 169-185.
4. Abriouel, H., Maqueda, M., Gálvez, A., Martínez-Bueno, M. and Valdivia, E. (2002). Inhibition of Bacterial Growth, Enterotoxin Production, and Spore Outgrowth in Strains of *Bacillus cereus* by Bacteriocin AS-48. *Applied Environmental Microbiology* **68**, 1473-1477.
5. Acco, M., Ferreira, F. S., Henriques, J. A. P. and Tondo, E. C. (2003). Identification of multiple strains of *Staphylococcus aureus* colonizing nasal mucosa of food handlers. *Food Microbiology* **20**, 489-493.
6. AFNOR (2005). ISO 22000 : 2005 – Système de management de la sécurité des denrées alimentaires : Exigences pour tout organisme appartenant à la chaîne alimentaire. 2^{ème} tirage, AFNOR, Paris
7. Agata, N., Ohta, M. and Yokoyama, K. (2002). Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *International Journal of Food Microbiology* **73**, 23-27.
8. Allmann M, Höfelein C, Köppel E, Lüthy J, Meyer R, Niederhauser C, Wegmüller B, Candrian U (1995) Polymerase chain reaction (PCR) for detection of pathogenic microorganisms in bacteriological monitoring of dairy products. *Research in Microbiology* **146**, 85-97.
9. Ampe, F., ben Omar, N., Moizan, C., Wachter, C. and Guyot, J.-P. (1999). Polyphasic Study of the Spatial Distribution of Microorganisms in Mexican Pozol, a Fermented Maize Dough, Demonstrates the Need for Cultivation-Independent Methods To Investigate Traditional Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 5464-5473.
10. Amy, L. R., Sacco, L., Hyder, A. and Black, R. E. (2000). Malnutrition as an underlying cause of childhood deaths associated with infectious diseases in developing countries. *Bulletin of the World Health Organization* **78**, 1207–1221.
11. Anand, S. K. and Griffiths, M. W. (2003). Quorum sensing and expression of virulence in *Escherichia coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* **85**, 1-9.
12. Andersson, A., Rönner, U. and Granum, P. E. (1995). What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*. *International Journal of Food Microbiology* **28**, 145-155.
13. Araujo, M., Sueiro, R. A., Gómez, M. J. and Garrido, M. J. (2004). Enumeration of *Clostridium perfringens* spores in groundwater samples: comparison of six culture media. *Journal of Microbiological Methods* **57**, 175- 180.

14. Aycicek, H., Cakiroglu, S. and Stevenson, T. H. (2005). Incidence of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat meals from military cafeterias in Ankara, Turkey. *Food Control* **16**, 531-534.
15. Bach, H.-J., Tomanova, J., Schloter, M. and Munch, J. C. (2002). Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *Journal of Microbiological Methods* **49**, 235- 245.
16. Bagamboula, C. F., Uyttendaele, M. and Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and p-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Food Microbiology* **21**, 33-42.
17. Bagge-Ravn, D., Ng, Y., Hjelm, M., Christiansen, J. N., Johansen, C. and Gram, L. (2003). The microbial ecology of processing equipment in different fish industries—analysis of the microflora during processing and following cleaning and disinfection. *International Journal of Food Microbiology* **87**, 239-250.
18. Baker, G. C., Smith, J. J. and Cowan, D. A. (2003a). Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *Journal of Microbiological Methods* **55**, 541- 555.
19. Baker, G. C., Tow, L. A. and Cowan, D. A. (2003b). PCR-based detection of non-indigenous microorganisms in 'pristine' environments. *Journal of Microbiological Methods* **53**, 157- 164.
20. Baric, S. and Dalla-Via, J. (2004). A new approach to apple proliferation detection: a highly sensitive real-time PCR assay. *Journal of Microbiological Methods* **57**, 135- 145.
21. Barth, H., Aktories, K., Popoff, M. R. and Stiles, B. G. (2004). Binary Bacterial Toxins: Biochemistry, Biology, and Applications of Common *Clostridium* and *Bacillus* Proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 373-402.
22. Beal, J. D., Niven, S. J., Campbell, A. and Brooks, P. H. (2002). The effect of temperature on the growth and persistence of *Salmonella* in fermented liquid pig feed. *International Journal of Food Microbiology* **79**, 99-104.
23. Beattie, S. H. and Williams, A. G. (2002). Growth and diarrhoeagenic enterotoxin formation by strains of *Bacillus cereus* *in vitro* in controlled fermentations and *in situ* in food products and a model food system. *Food Microbiology* **19**, 329-340.
24. Bell, C. (2002). Approach to the control of entero-haemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). *International Journal of Food Microbiology* **78**, 197-216.
25. Blackburn, C. d. W., Curtis, L. M., Humpheson, L., Billon, C. and McClure, P. J. (1997). Development of thermal inactivation models for *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 with temperature, pH and NaCl as controlling factor. *International Journal of Food Microbiology* **38**, 31-44.
26. Borge, G. I. A., Skeie, M., Sorhaug, T., Langsrud, T. and Granum, P. E. (2001). Growth and toxin profiles of *Bacillus cereus* isolated from different food sources. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 237-246.
27. Boziaris, I. S. and Adams, M. R. (1999). Effect of chelators and nisin produced *in situ* on inhibition and inactivation of Gram negatives. *International Journal of Food Microbiology* **53**, 105-113.

28. Brüggemann, J., Stephen, J. R., Chang, Y.-J., Macnaughton, S. J., Kowalchuk, G. A., Kline, E. and White, D. C. (2000). Competitive PCR–DGGE analysis of bacterial mixtures : an internal standard and an appraisal of template enumeration accuracy. *Journal of Microbiological Methods* **40**, 111- 123.
29. Brynestad, S. and Granum, P. E. (2002). *Clostridium perfringens* and foodborne infections. *International Journal of Food Microbiology* **74**, 195-202.
30. Buchanan, R. L. and Edelson, S. G. (1999). Effect of pH-dependent, stationary phase acid resistance on the thermal tolerance of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology* **16**, 447-458.
31. Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* **94**, 223-253.
32. Caplice, E. and Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology* **50**, 131-149.
33. Chen, T. R., Chiou, C. S. and Tsen, H. Y. (2004). Use of novel PCR primers specific to the genes of *staphylococcal enterotoxin* G, H, I for the survey of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food-poisoning cases and food samples in Taiwan. *International Journal of Food Microbiology* **92**, 189-197.
34. Cheng, H.-Y., Yu, R.-C. and Chou, C.-C. (2003). Increased acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by acid adaptation time and conditions of acid challenge. *Food Research International* **36**, 49-56.
35. Cherif, A., Brusetti, L., Borin, S., Rizzi, A., Boudabous, A., Khyami-Horani, H. and Daffonchio, D. (2003). Genetic relationship in the 'Bacillus cereus group' by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a Bacillus anthracis-specific rep-PCR fragment. *Journal of Applied Microbiology* **94**, 1108-1119.
36. Cheun, H. I., Makino, S.-I., Watarai, M., Erdenebaatar, J., Kawamoto, K. and Uchida, I. (2003). Rapid and effective detection of anthrax spores in soil by PCR. *Journal of Applied Microbiology* **95**, 728-733.
37. China B, Ghafir Y, Daube G (2002) Estimation quantitative et qualitative par amplification génétique des bactéries présentes dans les denrées alimentaires. *Ann. Méd. Vét.* **147**, 99-109.
38. Chi-Zhang, Y., Yam, K. L. and Chikindas, M. L. (2004). Effective control of *Listeria monocytogenes* by combination of nisin formulated and slowly released into a broth system. *International Journal of Food Microbiology* **90**, 15-22.
39. Christaki, T. and Tzia, C. (2002). Quality and safety assurance in winemaking. *Food Control* **13**, 503-517.
40. Chung, O.K. and Pomeranz, Y. (1985) Amino acids in cereal proteins and protein fractions. In J.W Finley and D.T Hopkins, eds Digestibility and amino acid availability in cereals and oilseeds p. 65- 107 St Paul, Minnesota, Etats-Unis, American Association of Cereal Chemists.
41. Chung, W. and Hancock, R. E. W. (2000). Action of lysozyme and nisin mixtures against lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology* **60**, 25–32.

42. Cintas, L. M., Casaus, P., Fernandez, M. F. and Hernandez, P. E. (1998). Comparative antimicrobial activity of enterocin L50, pediocin PA-1, nisin A and lactocin S against spoilage and foodborne pathogenic bacteria. *Food Microbiology* **15**, 289-298.
43. Cissé, M., Sow, A., Thiaw, C., Mbaye, N. and Samb, A. (1997). Étude bactériologique des rhinopharyngites purulentes de l'enfant au Sénégal. *Archives de Pédiatrie*, **4** (12), 1192-1196.
44. Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F. and Chikindas, M. L. (2001). Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology* **71**, 1-20.
45. CNERNA-CNRS (1993). La qualité microbiologique des aliments : maîtrise et critères. In Commission Evaluation de la Qualité Microbiologique des Aliments, pp. 394 (352-123): Edition Polytechnica.
46. Collado, J., Fernández, A., Rodrigo, M., Camats, J. and Lopez, A. M. (2003). Kinetics of deactivation of *Bacillus cereus* spores. *Food Microbiology* **20**, 545-548.
47. Coroller, L., Leguérinel, I. and Mafart, P. (2001). Effect of Water Activities of Heating and Recovery Media on Apparent Heat Resistance of *Bacillus cereus* Spores. *Appl Environ Microbiol* **67**, 317-322.
48. Coulin, P., Farah, Z., Assanvo, J., Spillmann, H. and Puhan, Z. (2006). Characterisation of the microflora of attiéké, a fermented cassava product, during traditional small-scale preparation. *International Journal of Food Microbiology* **106**, 131-136.
49. Counil, E. (2000). Les bouillies de mil fermenté à Ouagadougou (Burkina Faso) : variabilité des procédés et des caractéristiques des produits. In Mémoire diplôme d'ingénieur agronome, pp. 35. Paris: INAP-G.
50. Dassenko, S. (1980). Effect of milling, fermentation and cooking on nutritive value of pearl millet (*Pennisetum americanum* (L.) Leeke). Thèse de doctorat. Kansas State University, Manhattan, Kansas, Etats-Unis.
51. de Benoist, B. (1994). Le sevrage : un défi pour l'enfant et sa mère. In *L'Alimentation de complément du jeune enfant*, pp. 69-74. Edited by ORSTOM éditions. Paris: Collection Colloques et séminaires.
52. de Benoist, B. (1999). Complementary feeding : a challenge to both children and mother. In *Complementary feeding of young children in Africa and Middle East*. Edited by Dop, M. C., Benbouzid, D., Trèche, S., de Benoist, B., Verster, A and Delpuech, F., World Health Organization, WHO, Geneva.
53. de Boer, E. and Beumer, R. R. (1999). Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* **50**, 119-130.
54. de Jong, A. E. I., Eijhusen, G. P., Brouwer-Post, E. J. F. and other authors (2003). Comparison of media for enumeration of *Clostridium perfringens* from foods. *Journal of Microbiological Methods* **54**, 359- 366.
55. de Jong, A. E. I., Rombouts, F. M. and Beumer, R. R. (2004). Behavior of *Clostridium perfringens* at low temperatures. *International Journal of Food Microbiology* **97**, 71-80.

56. Dean, T. R., Betancourt, D. and Menetrez, M. Y. (2004). A rapid DNA extraction method for PCR identification of fungal indoor air contaminants. *Journal of Microbiological Methods* **56**, 431- 434.
57. Delpeuch, F. (1995). Synthèse sur les pratiques de sevrage en Afrique et perspectives sur les améliorations nécessaires. In *L'Alimentation de complément du jeune enfant*, pp. 49-64. Edited by ORSTOM éditions. Paris: collection Colloques et séminaires.
58. Díez, B., Pedrós-Alió, C., Marsh, T. L. and Massana, R. (2001). Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) To Study the Diversity of Marine Picoeukaryotic Assemblages and Comparison of DGGE with Other Molecular Techniques. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 2942-2951.
59. Domig, K. J., Mayer, H. K. and Kneifel, W. (2003a). Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. -1. Media for isolation and enumeration. *International Journal of Food Microbiology* **88**, 147-164.
60. Domig, K. J., Mayer, H. K. and Kneifel, W. (2003b). Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* spp. - 2. Pheno- and genotypic criteria. *International Journal of Food Microbiology* **88**, 165-188.
61. Duffy, G., Whiting, R. C. and Sheridan, J. J. (1999). The effect of a competitive microflora, pH and temperature on the growth kinetics of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology* **16**, 299-307.
62. Dufrenne, J., Soentoro, P., Tatini, S., Day, T. and Notermans, S. (1994). Characteristics of *Bacillus cereus* related to safe food production. *International Journal of Food Microbiology* **23**, 99-109.
63. Eastman, P. (1980). An end to pounding. A new mechanical flour milling system in use in Africa. Ottawa, Canada, Centre de recherche pour le développement international. 63 p.
64. Eisgruber, H., Geppert, P., Sperner, B. and Stolle, A. (2003). Evaluation of different methods for the detection of *Clostridium perfringens* phosphatases. *International Journal of Food Microbiology* **82**, 81-86.
65. Eisgruber, H., Schalch, B., Sperner, B. and Stolle, A. (2000). Comparison of four routine methods for the confirmation of *Clostridium perfringens* in food. *International Journal of Food Microbiology* **57**, 135-140.
66. Ercolini, D. (2004). PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods* **56**, 297- 314.
67. FAO/WHO (1990). Structure et caractéristiques de l'économie mondiale du mil. In *CCP:GR 90/4*, pp. 15. Rome.
68. FAO/WHO (1991). Annuaire de la production 1990. In *Série statistique de la FAO n° 99*. Rome.
69. FAO/WHO (1995a). Le sorgho et les mils dans la nutrition humaine. In *Alimentation et nutrition*, no 27. Rome.
70. FAO/WHO (1995b). Report of a Joint FAO/WHO Workshop on fermentation as a household technology to improve food safety. Edited by WHO/FNU/FOS/96.1. Pretoria, South-Africa.

71. FAO/WHO (1997). Report of the twenty-ninth session of the Codex Committee on Food Additives and Contaminants, pp. 17-21. Edited by E. C. o. F. Additives. The Hague, The Netherlands.
72. Farrelly, V. , Rainey, F.A. and Stackebrandt, E. (1995) Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Applied and Environmental Microbiology* **61**, 2798-2801.
73. Fasoli, S., Marzotto, M., Rizzotti, L., Rossi, F., Dellaglio, F. and Torriani, S. (2003). Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *International Journal of Food Microbiology* **82**, 59-70.
74. Fernandez, A., Ocio, M. J., Fernandez, P. S. and Martinez, A. (2001). Effect of heat activation and inactivation conditions on germination and thermal resistance parameters of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology* **63**, 257-264.
75. Fitzsimons, N. A., Akkermans, A. D. L., de Vos, W. M. and Vaughan, E. E. (2003). Bacterial gene expression detected in human faeces by reverse transcription-PCR. *Journal of Microbiological Methods* **55**, 133- 140.
76. Florez, A. B. and Mayo, B. (2006). PCR-DGGE as a tool for characterizing dominant microbial populations in the Spanish blue-veined Cabrales cheese. *International Dairy Journal* **16**, 1205-1210.
77. Fontana, C., Vignolo, G. and Coconcelli, P. S. (2005). PCR–DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry fermented sausages. 254-263.
78. Franz, C. M. A. P., Stiles, M. E., Schleifer, K. H. and Holzapfel, W. H. (2003). Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology* **88**, 105-122.
79. Freeman, J. E., Kramer, N. W. and Watson, S. A. (1968). Gelatinization of starches from corn (*Zea mays* L.) and sorghum (*Sorghum bicolor* L. Moench). Effects of genetic and environmental factors. *Crop Sci* **8**, 409-413.
80. Fykse, E. M., Olsen, J. S. and Skogan, G. (2003). Application of sonication to release DNA from *Bacillus cereus* for quantitative detection by real-time PCR. *Journal of Microbiological Methods* **55**, 1- 10.
81. Gaillard, S., Leguerinel, I. and Mafart, P. (1998a). Modelling combined effects of temperature and pH on the heat resistance of spores of *Bacillus cereus*. *Food Microbiology* **15**, 625-630.
82. Gaillard, S., Leguerinel, I. and Mafart, P. (1998b). Model for Combined Effects of Temperature, pH and Water Activity on Thermal Inactivation of *Bacillus cereus* Spores. *Journal of Food Science* **63**, 887-889.
83. Gänzle, M. G., Hertel, C. and Hammes, W. P. (1999). Resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* against nisin and curvacin A. *International Journal of Food Microbiology* **48**, 37-50.
84. Ghelardi, E., Celandroni, F., Salvetti, S., Barsotti, C., Baggiani, A. and Senesi, S. (2002). Identification and characterization of toxigenic *Bacillus cereus* isolates responsible for two food-poisoning outbreaks. *FEMS Microbiology Letters* **208**, 129-134.

85. Gill, A. O. and Holley, R. A. (2000). Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. *Food Research International* **33**, 83-90.
86. González, R. D., Tamagnini, L. M., Olmos, P. D. and de Sousa, G. B. (2003). Evaluation of a chromogenic medium for total coliforms and *Escherichia coli* determination in ready-to-eat foods. *Food Microbiology* **20**, 601-604.
87. Granum, P. E. (1990). *Clostridium perfringens* toxins involved in food poisoning. *International Journal of Food Microbiology* **10**, 101-111.
88. Guerlava, P., Nolf, S. and Tholozan, J. L. (1998). Rapid cooling, moderate heat treatment and nisin addition influence cell homeostasis of *Clostridium perfringens* type A. *International Journal of Food Microbiology* **39**, 195-203.
89. Guiraud, J. P. (1998). *Microbiologie alimentaire*. Paris: Dunod.
90. Gurtler, J. B., Kornacki, J. L. and Beuchat, L. R. (2005). *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *International Journal of Food Microbiology* **104**, 1-34.
91. Hamada-Sato, N., Usui, K., Kobayashi, T., Imada, C. and Watanabe, E. (2005). Quality assurance of raw fish based on HACCP concept. *Food Control* **16**, 301-307.
92. Hansen, B. M. and Hendriksen, N. B. (2001). Detection of Enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains by PCR Analysis. *Applied And Environmental Microbiology* **67**, 185-189.
93. Hansen, B. M. and Hendriksen, N. B. (2001). Detection of Enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains by PCR Analysis. *Applied And Environmental Microbiology* **67**, 185-189.
94. Hansen, B. M., Damgaard, P. H., Eilenberg, J. and Pedersen, J. C. (1998). Molecular and Phenotypic Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from Leaves and Insects. *Journal of Invertebrate Pathology* **71**, 106-114.
95. Hansen, B. M., Leser, T. D. and Hendriksen, N. B. (2001). Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells. *FEMS Microbiology Letters* **202**, 209-213.
96. Haque, A. and Russell, N. J. (2005). Phenotypic and genotypic characterisation of *Bacillus cereus* isolates from Bangladeshi rice. *International Journal of Food Microbiology* **98**, 23-34.
97. Helander, I. M. & Mattila-Sandholm, T. (2000). Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. *International Journal of Food Microbiology* **60**, 153-161
98. Henning, S., Metz, R. and Hammes, W. P. (1986). Studies on the mode of action of nisin. *International Journal of Food Microbiology* **3**, 121-134.
99. Heyrman, J. and Swings, J. (2001). 16S rDNA Sequence Analysis of Bacterial Isolates from Biodeteriorated Mural Paintings in the Servilia Tomb (Necropolis of Carmona, Seville, Spain). *Systematic and Applied Microbiology* **24**, 417-422.
100. Hoorstra, E., Northolt, M. D., Notermans, S. and Barendsz, A. W. (2001). The use of quantitative risk assessment in HACCP. *Food Control* **12**, 229-234.
101. Huang, L. (2003). Dynamic computer simulation of *Clostridium perfringens* growth in cooked ground beef. *International Journal of Food Microbiology* **87**, 217-227.

102. Institut Pasteur (1994). Collection of bacterial strains of Institut Pasteur, Sixth edn.
103. International Food Safety Authorities Network (2005). *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula, pp. 1-4: INFOSAN Information Note No. 1/2005 - *Enterobacter sakazakii*.
104. Iversen, C. and Forsythe, S. (2004). Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other Enterobacteriaceae from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiology* **21**, 771-777.
105. Iversen, C., Druggan, P. and Forsythe, S. (2004). A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *International Journal of Food Microbiology* **96**, 133-139.
106. Jambunathan, R. and Subramanian, V. (1988). Grain quality and utilization of sorghum and pearl millet. In *Biotechnology in tropical crop improvement*. Proceedings of the International Biotechnology Workshop, Patancheru, Inde, 12-15 janvier 1987, p. 133-139. Patancheru, ICRISAT.
107. Jamuna, M., Babusha, S. T. and Jeevaratnam, K. (2005). Inhibitory efficacy of nisin and bacteriocins from *Lactobacillus* isolates against food spoilage and pathogenic organisms in model and food systems. *Food Microbiology* **22**, 449-454.
108. Ji, N., Peng, B., Wang, G., Wang, S. and Peng, X. (2004). Universal primer PCR with DGGE for rapid detection of bacterial pathogens. *Journal of Microbiological Methods* **57**, 409-413.
109. Juneja, V. K. and Thippareddi, H. (2004). Inhibitory effects of organic acid salts on growth of *Clostridium perfringens* from spore inocula during chilling of marinated ground turkey breast. *International Journal of Food Microbiology* **93**, 155-163.
110. Kalchayanand, N., Dunne, C. P., Sikes, A. and Ray, B. (2004). Germination induction and inactivation of *Clostridium* spores at medium-range hydrostatic pressure treatment. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* **5**, 277-283.
111. Kandhai, M. C., Reij, M. W., Gorris, L. G., Guillaume-Gentil, O. and van Schothorst, M. (2004). Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *The Lancet* **363**, 39-40.
112. Kang, C. K., Woodburn, M., Pagenkopf, A. and Cheney, R. (1969). Growth, sporulation, and germination of *Clostridium perfringens* in Media of Controlled Water Activity. *Applied Microbiology* **18**, 798-805.
113. Kisand, V. and Wikner, J. (2003). Limited resolution of 16S rDNA DGGE caused by melting properties and closely related DNA sequences. *Journal of Microbiological Methods* **54**, 183-191.
114. Klein, G. n. (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *International Journal of Food Microbiology* **88** (2003) 123- 131.
115. Kunene, N. F., Hastings, J. W. and von Holy, A. (1999). Bacterial populations associated with a sorghum-based fermented weaning cereal. *International Journal of Food Microbiology* **49**, 75-83.

116. Kusumaningrum, H. D., Riboldi, G., Hazeleger, W. C. and Beumer, R. R. (2003). Survival of foodborne pathogens on stainless steel surfaces and cross-contamination to foods. *International Journal of Food Microbiology* **85**, 227-236.
117. Kuwano, K., Tanaka, N., Shimizu, T., Nagatoshi, K., Nou, S. and Sonomoto, K. (2005). Dual antibacterial mechanisms of nisin Z against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Antimicrobial Agents* **26**, 396-402.
118. Kvenberg, J., Stolfa, P., Stringfellow, D. and Garrett, E. S. (2000). HACCP development and regulatory assessment in the United States of America. *Food Control* **11**, 387-401.
119. Langa, S., Fernández, A., Martín, R., Reviriego, C., Marín, M. L., Fernández, L. and Rodríguez, J. M. (2003). Differentiation of *Enterococcus faecium* from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* strains by PCR and dot-blot hybridisation. *International Journal of Food Microbiology* **88**, 197-200.
120. Leguerinel, I. and Mafart, P. (2001). Modelling the influence of pH and organic acid types on thermal inactivation of *Bacillus cereus* spores. *International Journal of Food Microbiology* **63**, 29-34.
121. Leguerinel, I., Couvert, O. and Mafart, P. (2000). Relationship between the apparent heat resistance of *Bacillus cereus* spores and the pH and NaCl concentration of the recovery medium. *International Journal of Food Microbiology* **55**, 223-227.
122. Lereclus, D., Sorokine, A., Faille, C., Schmitt, P. and Nguyen-the, C. (2004). Le Point : *Bacillus cereus*, le bon, la brute et le truand. In *INRA mensuel de mars, journal interne*, pp. 28-35.
123. Leuschner, R. G., Heidel, M. and Hammes, W. P. (1998). Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* **39**, 1-10.
124. Malleshi, N.G. and Desikachar, H.S.R. (1982). Formulation of a weaning food with low hot paste viscosity based on malted ragi (*Eleusine coracana*) and green gram (*Phaseolus radiatus*). *Journal of Food Sci. Technol.* **19**, 193- 197.
125. Malorny, B., Tassios, P. T., Radström, P., Cook, N., Wagner, M. and Hoorfar, J. (2003). Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* **83**, 39-48.
126. Manafi, M. (2000). New developments in chromogenic and fluorogenic culture media. *International Journal of Food Microbiology* **60** (2000) 205–218.
127. Manafi, M. and Rotter, M. L. (1991). A new plate medium for rapid presumptive identification and differentiation of *enterobacteriaceae*. *International Journal of Food Microbiology* **14**, 127-134.
128. Manero, A. and Blanch, A. R. (1999). Identification of *Enterococcus* spp. with a Biochemical Key. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 4425-4430.
129. Manfreda, G., De Cesare, A., Bondioli, V. and Franchini, A. (2003). Comparison of the BAXR System with a multiplex PCR method for simultaneous detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental samples. *International Journal of Food Microbiology* **87**, 271-278.

130. Manzano, M., Cocolin, L., Cantoni, C. and Comi, G. (2003a). *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique. *International Journal of Food Microbiology* **81**, 249-254.
131. Manzano, M., Cocolin, L., Iacumin, L., Cantoni, C. and Comi, G. (2005). A PCR-TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis) technique to assess differentiation among enological *Saccharomyces cerevisiae* strains. *International Journal of Food Microbiology* **101**, 333-339.
132. Manzano, M., Giusto, C., Iacumin, L., Cantoni, C. and Comi, G. (2003b). A molecular method to detect *Bacillus cereus* from a coffee concentrate sample used in industrial preparations. *Journal of Applied Microbiology* **95**, 1361-1366.
133. Maraki, S., Stylianoudaki, E., Nioti, E. and Tselentis, Y. (2005). Catalase-negative *Staphylococcus aureus* wound infection: Case report and review. *Clinical Microbiology Newsletter* **27**, 175-177.
134. Martín, M. C., Fueyoa, J. M., González-Hevia, M. A. and Mendoza, M. C. (2004). Genetic procedures for identification of enterotoxigenic strains of *Staphylococcus aureus* from three food poisoning outbreaks. *International Journal of Food Microbiology* **94**, 279-286.
135. Martín, M. C., González-Hevia, M. A. and Mendoza, M. C. (2003). Usefulness of a two-step PCR procedure for detection and identification of enterotoxigenic *staphylococci* of bacterial isolates and food samples. *Food Microbiology* **20**, 605-610.
136. Matlon, P. J. (1990). Improving productivity in sorghum and pearl millet in semi-arid Africa. *Food Res Inst Stud* **22**, 1-43.
137. McCabe-Sellers, B. J. and Beattie, S. E. (2004). Food safety: Emerging trends in foodborne illness surveillance and prevention. *Journal of the American Dietetic Association* **104**, 1708-1717.
138. Mead, G. C. (1985). Selective and differential media for *Clostridium perfringens*. *International Journal of Food Microbiology* **2**, 89-98.
139. Meghrou, J., Lacroix, C. and Simard, R. E. (1999). The effects on vegetative cells and spores of three bacteriocins from lactic acid bacteria. *Food Microbiology* **16**, 105-114.
140. Miambi, E., Guyot, J.-P. and Ampe, F. (2003). Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an integrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. *International Journal of Food Microbiology* **82**, 111-120.
141. Molina, P. M., Sanz, M. E., Lucchesi, P. M. A., Padola, N. L. and Parma, A. E. (2005). Effects of acidic broth and juices on the growth and survival of verotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Food Microbiology* **22**, 469-473.
142. Morot-Bizot, S., Talon, R. and Leroy-Setrin, S. (2003). Development of specific PCR primers for a rapid and accurate identification of *Staphylococcus xylosus*, a species used in food fermentation. *Journal of Microbiological Methods* **55**, 279- 286.
143. Mosha, A.C. and Svanberg, U. (1983). Preparation of weaning foods with high nutrient density using flour of germinated cereals. *Food Nutr. Bull.* **5**, 10- 14.

144. Motarjemi, Y. (2002). Impact of small scale fermentation technology on food safety in developing countries. *International Journal of Food Microbiology* **75**, 213-229.
145. Motarjemi, Y. and Asante, A., (2002). Impact of small scale fermentation technology on food safety in developing countries. *International Journal of Food Microbiology* **75**, 215-231.
146. Motarjemi, Y., Kaferstein, F., Moy, G. and Quevedo, F. (1993). Contaminated weaning food: a major risk factor for diarrhoea and associated malnutrition. *Bulletin of the World Health Organization* **71**, 79-92.
147. Mugula, J. K., Nnko, S. A. M., Narvhus, J. A. and Sørhaug, T. (2003). Microbiological and fermentation characteristics of togwa, a Tanzanian fermented food. *International Journal of Food Microbiology* **80**, 187-199.
148. Mundo, M. A., Padilla-Zakour, O. I. and Worobo, R. W. (2004). Growth inhibition of foodborne pathogens and food spoilage organisms by select raw honeys. *International Journal of Food Microbiology* **97**, 1-8.
149. Muyanja, C. M. B. K., Narvhus, J. A., Treimo, J. and Langsrud, T. (2002). Isolation, characterisation and identification of lactic acid bacteria from bushera: a Ugandan traditional fermented beverage. *International Journal of Food Microbiology* **80**, 201-210.
150. Muyer, G., de Waal, E. C., Uitterlinden, A. G., (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environ. Microbiol.* **59**, 695-700.
151. Nazarowec-White, M. and Farber, J.M. (1997) *Enterobacter sakazakii*: a review. *International Journal of Food Microbiology* **34**, 103-113.
152. Nejari, N., Benomar, S. and Lahbabi, M. S. (2000). Les infections nosocomiales en réanimation néonatale et pédiatrique. Intérêt de la ciprofloxacine: Nosocomial infections in neonatal and pediatric intensive care. The appeal of ciprofloxacin. *Archives de Pédiatrie* **7**, 1268-1273.
153. Nguyen-The, C., Carlin, F. and Guinebretière, M. H. (2003). *Bacillus cereus* et sécurité alimentaire. *Bulletin de la Société française de Microbiologie* **18**, 104-112.
154. Nicolaisen, M. H. and Ramsing, N. B. (2002). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) approaches to study the diversity of ammonia-oxidizing bacteria. *Journal of Microbiological Methods* **50**, 189-203.
155. Notermans, S. and in't Veld, P. (1994). Microbiological challenge testing for ensuring safety of food products. *International Journal of Food Microbiology* **24**, 33-39.
156. Notermans, S. and Mead, G. C. (1996). Incorporation of elements of quantitative risk analysis in the HACCP system. *International Journal of Food Microbiology* **30**, 157-173.
157. Notermans, S., in't Veld, P. H., Wijtzes, T. and Mead, G. C. (1993). A user's guide to microbial challenge testing for ensuring the safety and stability of food products. *Food Microbiology* **10**, 145-157.
158. Nyatoti, V. N., Mtero, S. S. and Rukure, G. (1997). Pathogenic *Escherichia coli* in traditional African weaning foods. *Food Control* **8**, 51-54.

159. Ogwaro, B. A., Gibson, H., Whitehead, M. and Hill, D. J. (2002). Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in traditional African yoghurt fermentation. *International Journal of Food Microbiology* **79**, 105-112.
160. Olmez, H. K. and Aran, N. (2005). Modeling the growth kinetics of *Bacillus cereus* as a function of temperature, pH, sodium lactate and sodium chloride concentrations. *International Journal of Food Microbiology* **98**, 135-143.
161. Olsvik, O., Wasteson, Y., Lund, A. and Hornes, E. (1991). Pathogenic *Escherichia coli* found in food. *International Journal of Food Microbiology* **12**, 103-113.
162. Orlando, C., Pinzani, P. and Pazzagli, M. (1998). Developments in quantitative PCR. *Clin Chem Lab Med* **36**, 255-269.
163. Osagie, A.U. and Kates, M. (1984). Lipid composition of millet (*Pennisetum americanum*) seeds. *Lipids*, **19**, 958-965.
164. Ovreas, L., Forney, L., Daae, F. and Torsvik, V. (1997). Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 3367-3373.
165. Palop A., Sala F. J. and Condon S. (1999). Heat Resistance of Native and Demineralized Spores of *Bacillus subtilis* Sporulated at Different Temperatures. *American Society for Microbiology*. **65**, 1316-1319.
166. Petit, L., Gibert, M. and Popoff, M. R. (1999). *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends in Microbiology* **7**, 104-110.
167. Prescott, Harley and Klein (1995). *Microbiologie*, Second edn. Bruxelles: De Boeck Université.
168. Prüß, B. M., Dietrich, R., Nibler, B., Märtlbauer, E. and Scherer, S. (1999). The Hemolytic Enterotoxin HBL Is Broadly Distributed among Species of the *Bacillus cereus* Group. *Applied And Environmental Microbiology* **65**, 5436-5442.
169. Purseglove, J. W. (1972). Tropical crops: monocotyledons, pp. 334. Londres: Longman Group Limited.
170. Radhika, B., Padmapriya, B. P., Chandrashekar, A., Keshava, N. and Varadaraj, M. C. (2002). Detection of *Bacillus cereus* in foods by colony hybridization using PCR-generated probe and characterization of isolates for toxins by PCR. *International Journal of Food Microbiology* **74**, 131-138.
171. Rajkovic, A., Uyttendaele, M., Courtens, T. and Debevere, J. (2005). Antimicrobial effect of nisin and carvacrol and competition between *Bacillus cereus* and *Bacillus circulans* in vacuum-packed potato puree. *Food Microbiology* **22**, 189-197.
172. Rantsiou, K., Iacumin, L., Cantoni, C., Comi, G. and Cocolin, L. (2005). Ecology and characterization by molecular methods of *Staphylococcus* species isolated from fresh sausages. *International Journal of Food Microbiology* **97**, 277-284.
173. Reardon, T. (1993). Cereals demand in the Sahel and potential impacts of regional cereals production. *World Dev* **21**, 17-35.

174. Reij, M.W., and Den Aantrekker, E.D. (2004) Recontamination as a source of pathogens in processed foods. *International Journal of Food Microbiology*, 91, 1-11.
175. Richards, G.M., Gurtler, J.B., and Beuchat, L.R. (2005) Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant rice cereal reconstituted with water, milk, liquid infant formula, or apple juice. *Journal of Applied Microbiology* 99, 844-850.
176. Rivas, R., Velázquez, E., Zurdo-Piñeiro, J. L., Mateos, P. F. and Molina, E. M. (2004). Identification of microorganisms by PCR amplification and sequencing of a universal amplified ribosomal region present in both prokaryotes and eukaryotes. *Journal of Microbiological Methods* 56, 413- 426.
177. Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., de-Roubin, M.-R. and Laurent, P. (2002). Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches. *Journal of Microbiological Methods* 49, 31- 54.
178. Rooney, L. W. and McDonough, C. M. (1987). Food quality and consumer acceptance in pearl millet. In *Proc international pearl millet workshop ICRISAT*, pp. 43-61. Edited by J. R. W. a. S. R. Beckerman. Patancheru, India.
179. Ross, T., Ratkowsky, D. A., Mellefont, L. A. and McMeekin, T. A. (2003). Modelling the effects of temperature, water activity, pH and lactic acid concentration on the growth rate of *Escherichia coli*. *International Journal of Food Microbiology* 82, 33-43.
180. Rosslund, E., Andersen, B. G. I., Langsrud, T. and Sorhaug, T. (2003). Inhibition of *Bacillus cereus* by strains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. *International Journal of Food Microbiology* 89, 205-212.
181. Rosslund, E., Langsrud, T. and Sorhaug, T. (2005b). Influence of controlled lactic fermentation on growth and sporulation of *Bacillus cereus* in milk. *International Journal of Food Microbiology* 103, 69-77.
182. Rosslund, E., Langsrud, T., Granum, P. E. and Sorhaug, T. (2005a). Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. *International Journal of Food Microbiology* 98, 193-200.
183. Ryuand, J.-H. and Beuchat, L. R. (1999). Changes in heat tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 after exposure to acidic environments. *Food Microbiology* 16, 317-324.
184. Sackey, B. A., Mensah, P., Collison, E. and Sakyi-Dawson, E. (2001). *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella* and *Escherichia coli* in live and dressed poultry from metropolitan Accra. *International Journal of Food Microbiology* 71, 21-28.
185. Samelis, J., Kakouri, A., Rogga, K. J., Savvaidis, I. N. and Kontominas, M. G. (2003). Nisin treatments to control *Listeria monocytogenes* post-processing contamination on Anthotyros, a traditional Greek whey cheese, stored at 4°C in vacuum packages. *Food Microbiology* 20, 661-669.
186. Sankara Rao, D.S. and Deosthale, Y.G. (1983). Mineral composition, ionizable iron and soluble zinc in malted grains of pearl millet and ragi. *Food Chem* 11: 217-223.
187. Sarrias, J. A., Valero, M. and Salmeron, M. C. (2002). Enumeration, isolation and characterization of *Bacillus cereus* strains from Spanish raw rice. *Food Microbiology* 19, 589-595.

188. Schulten, S. M., in't Veld, P. H., Nagelkerke, N. J. D., Scotter, S. L., de Buyser, M. L., Rollier, P. and Lahellec, C. (2000). Evaluation of the ISO 7932 standard for the enumeration of *Bacillus cereus* in foods. *International Journal of Food Microbiology* **57**, 53-61.
189. Scott, V. N. (2005). How does industry validate elements of HACCP plans? *Food Control* **16**, 497-503.
190. Seenappa, M. (1988). Sorghum and millets in East Africa with reference to their use in weaning foods. In D. Alnwick, S. Moses and O.G. Schmidt, éd. Improving young child feeding in eastern and southern Africa p. 39-54. Nairobi, Kenya, Centre de recherche pour le développement international.
191. Seenappa, M. (1988). Sorghum and millets in East Africa with reference to their use in weaning foods. In D. Alnwick, S. Moses and O.G. Schmidt, éd. Improving young child feeding in eastern and southern Africa p. 39-54. Nairobi, Kenya, Centre de recherche pour le développement international.
192. Seetharam, A., Riley, K. W. and Harinarayana, G. (1989). Small millets in global agriculture, pp. 392. New Delhi, Inde: Oxford and IBH.
193. Serna-Saldivar, S.D., McDonough, C.M. and Rooney, L.W. (1991). The millets. In K.J. Lorenz and K. Kulp, éd. *Handbook of cereal science and technology* p. 271-300. New York, Marcel Dekker.
194. Shangkuan, Y.-H., Yang, J.-F., Lin, H.-C. and Shaio, M.-F. (2000). Comparison of PCR-RFLP, ribotyping and ERIC-PCR for typing *Bacillus anthracis* and *Bacillus cereus* strains. *Journal of Applied Microbiology* **89**, 452-462.
195. Sheorain, V.S. and Wagle, D.S. (1973). Beta-amylase activity in germinated bajra and barley varieties. *Journal of Food Sci. Technol.*, **10**, 184-186.
196. Shinagawa, K. (1990). Analytical methods for *Bacillus cereus* and other *Bacillus* species. *International Journal of Food Microbiology* **10**, 125-141.
197. Sickbert-Bennett, E. E., Weber, D. J., Gergen-Teague, M. F., Sobsey, M. D., Samsa, G. P. and Rutala, W. A. (2005). Comparative efficacy of hand hygiene agents in the reduction of bacteria and viruses. *American Journal of Infection Control* **33**, 67-77.
198. Sikes, A. and Ehioba, R. (1999). Feasibility of using food-grade additives to control the growth of *Clostridium perfringens*. *International Journal of Food Microbiology* **46**, 179-185.
199. Simmon, K. E., Steadman, D. D., Durkin, S., Baldwin, A., Jeffrey, W. H., Sheridan, P., Horton, R. and Shields, M. S. (2004). Autoclave method for rapid preparation of bacterial PCR-template DNA. *Journal of Microbiological Methods* **56**, 143-149.
200. Sinell, H.-J. (1995). Control of food-borne infections and intoxications. *International Journal of Food Microbiology* **25**, 209-217.
201. Sinton, L. W., Donnison, A. M. and Hastie, C. M. (1993a). Faecal streptococci as faecal pollution indicators: a review - Part I: Taxonomy and enumeration. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **27**, 101-115.
202. Sinton, L. W., Donnison, A. M. and Hastie, C. M. (1993b). Faecal streptococci as faecal pollution indicators: a review - Part II: Sanitary significance, survival, and use. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* **27**, 117-137.

203. Skovgaard, N. (2003). PCR Detection of Microbial Pathogens. *Methods in Molecular Biology. International Journal of Food Microbiology* **86**, 305-306.
204. Somda, J. C. (1994). Les pratiques du sevrage au Burkina Faso. In *L'Alimentation de complément du jeune enfant*, pp. 15-26. Edited by ORTSOM éditions. Paris.
205. Sperber, W. H. (2005a). HACCP and transparency. *Food Control* **16**, 505-509.
206. Sperber, W. H. (2005b). HACCP does not work from Farm to Table. *Food Control* **16**, 511-514.
207. Stoll, B. J., Hansen, N., Fanaroff, A. A. and Lemons, J. A. (2004). *Enterobacter sakazakii* is a rare cause of neonatal septicemia or meningitis in vlbw infants. *The Journal of Pediatrics* **144**, 821-823.
208. Sutherland, J. P., Aherne, A. and Beaumont, A. L. (1996). Preparation and validation of a growth model for *Bacillus cereus*: the effects of temperature, pH, sodium chloride and carbon dioxide. *International Journal of Food Microbiology* **30**, 359-372.
209. Sutherland, J. P., Bayliss, A. J. and Braxton, D. S. (1995). Predictive modelling of growth of *Escherichia coli* O157:H7: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology* **25**, 29-49.
210. Sutra, L., Federighi, M. and Jouve, J. L. (1998). *Manuel de Bactériologie Alimentaire*. Paris: Poytechnica.
211. Svensson, B., Ekelund, K., Ogura, H. and Christiansson, A. (2004). Characterisation of *Bacillus cereus* isolated from milk silo tanks at eight different dairy plants. *International Dairy Journal* **14**, 17-27.
212. te Giffel, M. C., Beumer, R. R., Leijendekkers, S. and Rombouts, F. M. (1996). Incidence of *Bacillus cereus* and *Bacillus subtilis* in foods in the Netherlands. *Food Microbiology* **13**, 53-58.
213. Tetteh, G. L. and Beuchat, L. R. (2003). Survival, growth, and inactivation of acid-stressed *Shigella flexneri* as affected by pH and temperature. *International Journal of Food Microbiology* **87**, 131-138.
214. Tetteh, G. L., Sefa-Dedeh, S. K., Phillips, R. D. and Beuchat, L. R. (2004). Survival and growth of acid-adapted and unadapted *Shigella flexneri* in a traditional fermented Ghanaian weaning food as affected by fortification with cowpea. *International Journal of Food Microbiology* **90**, 189-195.
215. Toh, M., Moffitt, M. C., Henrichsen, L., Raftery, M., Barrow, K., Cox, J. M., Marquis, C. P. and Neilan, B. A. (2004). Cereulide, the emetic toxin of *Bacillus cereus*, is putatively a product of nonribosomal peptide synthesis. *Journal of Applied Microbiology* **97**, 992-1000.
216. Toze, S. (1999). PCR and the detection of microbial pathogens in water and wastewater. *Water Research* **33**, 3554-3556.
217. Trèche, S. (1998). Les farines infantiles : enjeux, contraintes, potentialités. *Bulletin du réseau Technologie et partenariat en agroalimentaire* **15**, 5-7.

218. Trèche, S. (1999). Technique for increasing the energy density of gruel. In Complementary feeding of young children in Africa and Middle East. Edité par Dop, M. C., Benbouzid, D., Trèche, S., de Benoist, B., Verster, A et Delpeuch, F., p. 101-109. WHO, Geneva.
219. Trkov, M. and Avgutin, G. (2003). An improved 16S rRNA based PCR method for the specific detection of *Salmonella enterica*. *International Journal of Food Microbiology* **80**, 67-75.
220. Trochimchuk, T., Fotheringham, J., Topp, E., Schraft, H. and Leung, K. T. (2003). A comparison of DNA extraction and purification methods to detect *Escherichia coli* O157:H7 in cattle manure. *Journal of Microbiological Methods* **54**, 165- 175.
221. Udayasekhara Rao, P. and Deosthale, Y.G. (1988). In vitro availability of iron and zinc in white and coloured ragi (*Eleusine coracana*): role of tannin and phytate. *Plant Foods Hum. Nutr.*, **38**: 35-41.
222. Ultee, A. and Smid, E. J. (2001). Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *International Journal of Food Microbiology*, 373-378.
223. Uyttendaele, M., Rajkovic, A., Benos, G., François, K., Devlieghere, F. and Debevere, J. (2003). Evaluation of challenge testing protocol to assess the stability of ready-to- eat meat products against growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **90**, 219-236.
224. Valero, M. and Francés, E. (2006). Synergistic bactericidal effect of carvacrol, cinnamaldehyde or thymol and refrigeration to inhibit *Bacillus cereus* in carrot broth. *Food Microbiology* **23**, 68-73.
225. Valero, M. and Salmeron, M. C. (2003). Antibacterial activity of 11 essential oils against *Bacillus cereus* in tyndallized carrot broth. *International Journal of Food Microbiology* **85**, 73– 81.
226. Valero, M., Fernandez, P. S. and Salmeron, M. C. (2003). Influence of pH and temperature on growth of *Bacillus cereus* in vegetable substrates. *International Journal of Food Microbiology* **82**, 71-79.
227. Valyasevi, R. and Rolle, R. S. (2002). An overview of small-scale food fermentation technologies in developing countries with special reference to Thailand: scope for their improvement. *International Journal of Food Microbiology* **75**, 231-239.
228. Van Immerseel, F., De Buck, J., Pasmans, F., Velge, P., Botreau, E., Fievez, V., Haesebrouck, F. and Ducatelle, R. (2003). Invasion of *Salmonella enteritidis* in avian intestinal epithelial cells in vitro is influenced by short-chain fatty acids. *International Journal of Food Microbiology* **85**, 237-248.
229. van Schothorst, M. (2005). A proposed framework for the use of FSOs. *Food Control* **16**, 811-816.
230. Vannini, L., Lanciotti, R., Baldi, D. and Guerzoni, M. E. (2004). Interactions between high pressure homogenization and antimicrobial activity of lysozyme and lactoperoxidase. *International Journal of Food Microbiology* **94**, 123-135.
231. Vestergaard, E. M. (2001). Building product confidence with challenge studies. *Dairy Food and Environmental Sanitation* **21**, 206-209.

232. Villani, F., Russo, F., Blaiotta, G., Moschetti, G. and Ercolini, D. (2005). Presence and characterisation of verotoxin producing *E. coli* in fresh Italian pork sausages, and preparation and use of an antibiotic-resistant strain for challenge studies. *Meat Science* **70**, 181-188.
233. Walser, P., Pfenninger, S. and Spinner, C. (2001). *Agents conservateurs pour denrées alimentaires*, Nouvelle édition, 2001 edn. Suisse: Le groupe de projet agents conservateurs.
234. Wang, R.-F., Cao, W.-W. and Cerniglia, C. E. (1997). A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *Journal of Applied Microbiology* **83**, 727-736.
235. Watterworth, L., Topp, E., Schraft, H. and Leung, K. T. (2005). Multiplex PCR-DNA probe assay for the detection of pathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods* **60**, 93-105.
236. WHO, F. N. P., Food Safety Unit, (1993). Contaminated food: a major cause of diarrhoea and associated malnutrition among infants and young children. *Facts Infant Feed* **3**, 1-4.
237. Whyte, R., Hudson, J. A., Hasell, S., Gray, M. and O'Reilly, R. (2001). Traditional Maori food preparation methods and food safety. *International Journal of Food Microbiology* **69**, 183-190.
238. Wilson, P. D. G., Brocklehurst, T. F., Arino, S., Thuault, D., Jakobsen, M., Lange, M., Farkas, J., Wimpenny, J. W. T. and Van Impe, J. F. (2002). Modelling microbial growth in structured foods: towards a unified approach. *International Journal of Food Microbiology* **73**, 275-289.
239. Wu, S.-J., Chan, A. and Kado, C. I. (2004). Detection of PCR amplicons from bacterial pathogens using microsphere agglutination. *Journal of Microbiological Methods* **56**, 395-400.
240. Zwietering, M. H. (2005). Practical considerations on food safety objectives. *Food Control* **16**, 817-823.

Annexes

Annexes

Annexe 1 : Résumé des comptages effectués sur les différents milieux (pour les granules, les valeurs sont données en UFC. g⁻¹)

N° site	Milieu de culture	Etape de prélèvement	Numérations (UFC × mL ⁻¹ ; *UFC × g ⁻¹)	Variation des comptages (UFC × mL ⁻¹ ; *UFC × g ⁻¹) n=2
1	Milieu MacConkey	Pâte en cours de fermentation	4,0 × 10 ⁶	3,9 × 10 ⁶ – 4,1 × 10 ⁶
		Pâte fermentée	7,8 × 10 ⁴	7,2 × 10 ⁴ – 8,4 × 10 ⁴
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	-	-
	Milieu Baird Parker	Pâte en cours de fermentation	4,3 × 10 ⁴	3,7 × 10 ⁴ – 4,8 × 10 ⁴
		Pâte fermentée	1,3 × 10 ⁴	1,2 × 10 ⁴ – 1,3 × 10 ⁴
		Bouillie cuite	4,0 × 10 ⁰	3,0 × 10 ⁰ – 5,0 × 10 ⁰
		* Granules	-	-
	Milieu MYP	Pâte en cours de fermentation	9,9 × 10 ⁶	9,4 × 10 ⁶ – 10,4 × 10 ⁶
		Pâte fermentée	3,1 × 10 ⁶	2,9 × 10 ⁶ – 3,3 × 10 ⁶
		Bouillie cuite	2,3 × 10 ¹	2,0 × 10 ¹ – 2,5 × 10 ¹
		* Granules	-	-
Milieu TSC	Pâte en cours de fermentation	8,7 × 10 ⁴	8,2 × 10 ⁴ – 9,1 × 10 ⁴	
	Pâte fermentée	1,9 × 10 ⁴	1,8 × 10 ⁴ – 1,9 × 10 ⁴	
	Bouillie cuite	3,5 × 10 ¹	3,0 × 10 ¹ – 4,0 × 10 ¹	
	* Granules	-	-	
2	Milieu MacConkey	Pâte en cours de fermentation	2,5 × 10 ⁵	2,1 × 10 ⁵ – 2,8 × 10 ⁵
		Pâte fermentée	1,6 × 10 ⁴	1,5 × 10 ⁴ – 1,6 × 10 ⁴
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	-	-
	Milieu Baird Parker	Pâte en cours de fermentation	3,3 × 10 ³	3,0 × 10 ³ – 3,6 × 10 ³
		Pâte fermentée	4,1 × 10 ³	3,8 × 10 ³ – 4,4 × 10 ³
		Bouillie cuite	3,3 × 10 ²	3,0 × 10 ² – 3,6 × 10 ²
		* Granules	-	-
	Milieu MYP	Pâte en cours de fermentation	3,1 × 10 ⁶	3,0 × 10 ⁶ – 3,2 × 10 ⁶
		Pâte fermentée	1,0 × 10 ⁷	9,8 × 10 ⁶ – 1,0 × 10 ⁷
		Bouillie cuite	2,0 × 10 ¹	1,8 × 10 ¹ – 2,2 × 10 ¹
		* Granules	-	-
Milieu TSC	Pâte en cours de fermentation	5,6 × 10 ⁴	5,2 × 10 ⁴ – 5,9 × 10 ⁴	
	Pâte fermentée	1,5 × 10 ⁶	1,4 × 10 ⁶ – 1,5 × 10 ⁶	
	Bouillie cuite	0,0	0,0	
	* Granules	-	-	

3	Milieu MacConkey	Pâte en cours de fermentation	$3,4 \times 10^4$	$3,3 \times 10^4 - 3,5 \times 10^4$
		Pâte fermentée	$1,5 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3 - 1,5 \times 10^3$
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	$6,1 \times 10^6$	$6,0 \times 10^6 - 6,1 \times 10^6$
	Milieu Baird Parker	Pâte en cours de fermentation	$1,9 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4 - 1,9 \times 10^4$
		Pâte fermentée	$1,3 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4 - 1,3 \times 10^4$
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	$5,8 \times 10^4$	$5,6 \times 10^4 - 6,0 \times 10^4$
	Milieu MYP	Pâte en cours de fermentation	$7,4 \times 10^4$	$7,2 \times 10^4 - 7,6 \times 10^4$
		Pâte fermentée	$1,0 \times 10^7$	$9,8 \times 10^6 - 1,0 \times 10^7$
		Bouillie cuite	$9,0 \times 10^0$	$8,0 \times 10^0 - 1,0 \times 10^1$
		* Granules	$2,2 \times 10^7$	$2,1 \times 10^7 - 2,3 \times 10^7$
Milieu TSC	Pâte en cours de fermentation	$6,5 \times 10^5$	$6,2 \times 10^5 - 6,7 \times 10^5$	
	Pâte fermentée	$1,3 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7 - 1,3 \times 10^7$	
	Bouillie cuite	$2,0 \times 10^0$	$1,0 \times 10^0 - 2,0 \times 10^0$	
	* Granules	$2,1 \times 10^7$	$2,0 \times 10^7 - 2,2 \times 10^7$	
4	Milieu MacConkey	Pâte en cours de fermentation	$5,1 \times 10^5$	$4,9 \times 10^5 - 5,3 \times 10^5$
		Pâte fermentée	$2,1 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3 - 2,4 \times 10^3$
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	$3,0 \times 10^5$	$2,8 \times 10^5 - 3,2 \times 10^5$
	Milieu Baird Parker	Pâte en cours de fermentation	$1,6 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4 - 2,0 \times 10^3$
		Pâte fermentée	$2,3 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5 - 2,5 \times 10^5$
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	$1,0 \times 10^5$	$9,8 \times 10^4 - 1,0 \times 10^5$
	Milieu MYP	Pâte en cours de fermentation	$4,9 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5 - 5,2 \times 10^5$
		Pâte fermentée	$1,3 \times 10^6$	$1,1 \times 10^6 - 1,5 \times 10^6$
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	$4,8 \times 10^6$	$4,7 \times 10^6 - 4,9 \times 10^6$
Milieu TSC	Pâte en cours de fermentation	$4,1 \times 10^6$	$4,0 \times 10^6 - 4,1 \times 10^6$	
	Pâte fermentée	$1,7 \times 10^6$	$1,7 \times 10^6 - 1,7 \times 10^6$	
	Bouillie cuite	$2,0 \times 10^0$	$1,0 \times 10^0 - 2,0 \times 10^0$	
	* Granules	$4,0 \times 10^7$	$4,0 \times 10^7 - 4,0 \times 10^7$	

5	Milieu MacConkey	Pâte en cours de fermentation	$6,5 \times 10^3$	$6,2 \times 10^3 - 6,8 \times 10^3$
		Pâte fermentée	$1,4 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3 - 1,6 \times 10^3$
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	$1,0 \times 10^4$	$9,0 \times 10^3 - 1,1 \times 10^4$
	Milieu Baird Parker	Pâte en cours de fermentation	$7,4 \times 10^3$	$7,1 \times 10^3 - 7,6 \times 10^3$
		Pâte fermentée	$8,2 \times 10^3$	$8,0 \times 10^3 - 8,4 \times 10^3$
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	$7,3 \times 10^4$	$7,2 \times 10^4 - 7,4 \times 10^4$
	Milieu MYP	Pâte en cours de fermentation	$8,1 \times 10^5$	$7,9 \times 10^5 - 8,3 \times 10^5$
		Pâte fermentée	$2,2 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5 - 2,4 \times 10^5$
		Bouillie cuite	$1,6 \times 10^3$	$1,5 \times 10^3 - 1,7 \times 10^3$
		* Granules	$4,2 \times 10^6$	$3,9 \times 10^6 - 4,5 \times 10^6$
Milieu TSC	Pâte en cours de fermentation	$2,1 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6 - 2,1 \times 10^6$	
	Pâte fermentée	$4,5 \times 10^6$	$4,2 \times 10^6 - 4,8 \times 10^6$	
	Bouillie cuite	0,0	0,0	
	* Granules	$9,2 \times 10^7$	$9,2 \times 10^7 - 9,2 \times 10^7$	
6	Milieu MacConkey	Pâte en cours de fermentation	$1,0 \times 10^3$	$9,0 \times 10^2 - 1,1 \times 10^3$
		Pâte fermentée	0,0	0,0
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	-	-
	Milieu Baird Parker	Pâte en cours de fermentation	$1,2 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3 - 1,3 \times 10^3$
		Pâte fermentée	$2,7 \times 10^3$	$2,4 \times 10^3 - 3,0 \times 10^3$
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	-	-
	Milieu MYP	Pâte en cours de fermentation	$1,5 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3 - 1,6 \times 10^3$
		Pâte fermentée	$1,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4 - 1,7 \times 10^4$
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	-	-
Milieu TSC	Pâte en cours de fermentation	$2,6 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4 - 3,0 \times 10^4$	
	Pâte fermentée	$4,8 \times 10^6$	$4,6 \times 10^6 - 5,0 \times 10^6$	
	Bouillie cuite	0,0	0,0	
	* Granules	-	-	

7	Milieu MacConkey	Pâte en cours de fermentation	$2,8 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4 - 3,0 \times 10^4$
		Pâte fermentée	0,0	0,0
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	$3,9 \times 10^4$	$3,7 \times 10^4 - 4,1 \times 10^4$
	Milieu Baird Parker	Pâte en cours de fermentation	$1,1 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4 - 1,1 \times 10^4$
		Pâte fermentée	$1,0 \times 10^3$	$9,0 \times 10^2 - 1,1 \times 10^3$
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	$7,6 \times 10^4$	$7,4 \times 10^4 - 7,8 \times 10^4$
	Milieu MYP	Pâte en cours de fermentation	$4,7 \times 10^4$	$4,5 \times 10^4 - 4,9 \times 10^4$
		Pâte fermentée	$2,3 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4 - 2,3 \times 10^4$
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	$1,6 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5 - 1,7 \times 10^5$
Milieu TSC	Pâte en cours de fermentation	$9,2 \times 10^5$	$8,8 \times 10^5 - 9,5 \times 10^5$	
	Pâte fermentée	$2,7 \times 10^7$	$2,6 \times 10^7 - 2,7 \times 10^7$	
	Bouillie cuite	0,0	0,0	
	* Granules	$4,9 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5 - 5,1 \times 10^5$	
8	Milieu MacConkey	Pâte en cours de fermentation	$1,0 \times 10^4$	$9,9 \times 10^3 - 1,0 \times 10^4$
		Pâte fermentée	0,0	0,0
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	$2,9 \times 10^7$	$2,8 \times 10^7 - 3,0 \times 10^7$
	Milieu Baird Parker	Pâte en cours de fermentation	$5,1 \times 10^5$	$4,9 \times 10^5 - 5,2 \times 10^5$
		Pâte fermentée	$8,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^2 - 1,0 \times 10^3$
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	$1,4 \times 10^5$	$1,4 \times 10^5 - 1,4 \times 10^5$
	Milieu MYP	Pâte en cours de fermentation	$2,7 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4 - 2,9 \times 10^4$
		Pâte fermentée	$3,5 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3 - 3,8 \times 10^3$
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	$1,7 \times 10^6$	$1,6 \times 10^6 - 1,7 \times 10^6$
Milieu TSC	Pâte en cours de fermentation	$4,6 \times 10^4$	$4,4 \times 10^4 - 4,8 \times 10^4$	
	Pâte fermentée	$3,5 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5 - 3,7 \times 10^5$	
	Bouillie cuite	0,0	0,0	
	* Granules	$2,5 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4 - 2,7 \times 10^4$	

9	Milieu MacConkey	Pâte en cours de fermentation	$1,2 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6 - 1,2 \times 10^6$
		Pâte fermentée	$1,9 \times 10^5$	$1,8 \times 10^5 - 1,9 \times 10^5$
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	$1,5 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6 - 1,5 \times 10^6$
	Milieu Baird Parker	Pâte en cours de fermentation	$8,4 \times 10^3$	$8,2 \times 10^3 - 8,6 \times 10^3$
		Pâte fermentée	$5,3 \times 10^3$	$5,1 \times 10^3 - 5,5 \times 10^3$
		Bouillie cuite	$7,2 \times 10^4$	$7,0 \times 10^4 - 7,4 \times 10^4$
		* Granules	$2,2 \times 10^6$	$2,1 \times 10^6 - 2,3 \times 10^6$
	Milieu MYP	Pâte en cours de fermentation	$3,9 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6 - 4,0 \times 10^6$
		Pâte fermentée	$1,4 \times 10^6$	$1,4 \times 10^6 - 1,4 \times 10^6$
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	$4,4 \times 10^4$	$4,2 \times 10^4 - 4,6 \times 10^4$
Milieu TSC	Pâte en cours de fermentation	$1,4 \times 10^6$	$1,2 \times 10^6 - 1,6 \times 10^6$	
	Pâte fermentée	$2,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6 - 2,4 \times 10^6$	
	Bouillie cuite	$6,0 \times 10^3$	$5,9 \times 10^3 - 6,0 \times 10^3$	
	* Granules	$8,8 \times 10^6$	$8,6 \times 10^6 - 9,0 \times 10^6$	
10	Milieu MacConkey	Pâte en cours de fermentation	$6,1 \times 10^4$	$5,9 \times 10^4 - 6,3 \times 10^4$
		Pâte fermentée	0,0	0,0
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	-	-
	Milieu Baird Parker	Pâte en cours de fermentation	$2,8 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4 - 3,0 \times 10^4$
		Pâte fermentée	$2,6 \times 10^4$	$2,4 \times 10^4 - 2,8 \times 10^4$
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	-	-
	Milieu MYP	Pâte en cours de fermentation	$8,2 \times 10^4$	$8,0 \times 10^4 - 8,4 \times 10^4$
		Pâte fermentée	$9,7 \times 10^5$	$9,5 \times 10^5 - 9,9 \times 10^5$
		Bouillie cuite	0,0	0,0
		* Granules	-	-
Milieu TSC	Pâte en cours de fermentation	$5,4 \times 10^5$	$5,3 \times 10^5 - 5,5 \times 10^5$	
	Pâte fermentée	$3,0 \times 10^4$	$2,7 \times 10^4 - 3,3 \times 10^4$	
	Bouillie cuite	$8,0 \times 10^3$	$7,8 \times 10^3 - 8,2 \times 10^3$	
	* Granules	-	-	

Annexe 2 : Application du système HACCP à la préparation traditionnelle du *ben-saalga* et du *ben-kida*

Etapes de Fabrication	Types de contamination	Moyens de contrôle	CCPs	Limites critiques	Procédures de suivi	Actions correctives
1. Matières Premières A/ mil	- Mycotoxines	- Avoir l'assurance du fournisseur des bonnes conditions de récolte et de stockage des grains	Oui	- Bonne senteur, bonne couleur, pas d'odeur de moisi	- Observation visuelle - Sentir	- Déclasser la matière première si possible changer de fournisseur
		- Stockage du mil dans un endroit sec et aéré - Limitation du temps de stockage		- Respecter les conditions de stockage - Réaliser le moins possible des stocks	- Surveiller les différents paramètres de stockage si possible et la couleur du mil	- Utiliser rapidement la matière première dès qu'une déviation est constatée
	- Agrochimiques	- Avoir l'assurance du fournisseur des bonnes conditions de récolte et de post-récolte - Bonne fermentation et bonne cuisson	Non			

<p>B/ ingrédients :</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Pathogènes : <i>Bacillus, E. coli, Salmonella, Staphylococcus, Clostridium, etc</i> - Physiques : insectes, pierres, tout corps étranger, 	<ul style="list-style-type: none"> - Lavage manuel à l'aide d'un récipient - Lavage à l'eau propre - Utiliser du sucre propre 	<p>Non</p> <p>Oui</p> <p>oui</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Pas d'insectes ou de fragments d'insectes ou de pierres ou tout autre corps étranger visible - Pas de signe de piqûres sur les grains - Pas de sable et de poussière visible - Pas de corps étrangers visibles - Pas d'odeur, 	<ul style="list-style-type: none"> - Observation visuelle et manuelle - observation 	<ul style="list-style-type: none"> - Refaire le lavage jusqu'à absence totale de corps étrangers - Eliminer les grains piqués - Refaire le lavage
-------------------------	--	--	--	---	---	--

gingembre, piment, menthe etc...	- Saleté, poussière, sables			de saveur, claire et limpide		
C/ sucre		- Utiliser que de l'eau potable - S'assurer de sa provenance	Oui	- Pas de dépôts dans le récipient	- Observation visuelle	- Nettoyer le sucre si possible sinon ne pas l'utiliser
D/ eau (**jus de tamarin)	- Saleté, poussière, insectes, bris de verres etc...	- Conserver dans un récipient propre et couvert	Oui	- Pas de dépôts ni de suspensions	- Observation visuelle - Goûter - Sentir	- Utiliser une autre source d'eau
		- Conserver dans un récipient en métal inox		- Bulles	- Observation visuelle	- Laver le récipient
	- Contaminations chimiques fonction de l'origine	- Utiliser de l'eau bouillie	Oui		- Observation	- Ne pas utiliser cette eau
			Oui			
	- Contaminations physiques : grains de sable, poussière	- Placer le récipient de réception dans la direction opposée au vent	Oui		- Observation visuelle	- Continuer l'ébullition
	- Pathogènes : E.					

2. *Vannage	<p><i>coli,</i> <i>Campylobacter,</i> <i>V. cholerae,</i> <i>Salmonella, etc...</i></p> <p>- Physiques : insectes, poussière, corps étrangers, environnement</p>	<p>- Nettoyage manuel</p> <p>- Couvrir le récipient de trempage</p>	Non			
3. *Lavage 1	<p>- Physiques : insectes, pierres, poussières, corps étrangers</p>		Non	<p>- Pas d'insectes, de pierres, de corps étrangers</p>		
4. Trempage	<p>- Physiques : insectes, pierre, poussières, corps étrangers</p>	<p>- Lavage manuel à l'aide d'un récipient</p>	Non	<p>- Pas d'insectes, de pierres, de corps étrangers visibles</p>		
	<p>- Physiques : insectes, pierres, poussières, corps étrangers</p>	<p>- Tri manuel</p>		<p>- Pas de trace de graisses flottant après broyage</p>	<p>- Observation visuelle et toucher</p>	<p>- Recommencer le lavage</p>

		commencer	Non			
	- Contamination par l'eau	- Laver le matériel à chaque usage				
	- Contamination par les mains et le matériel	- Fermer le récipient de décantation	Non			
	- Contamination par le matériel	- Se laver les mains avant de commencer	Non			
	- Physiques : insectes, poussière, corps étrangers	- Utiliser de l'eau saine	Non			
8. *Tamisage	- Contamination par les mains		Non			
	- Contamination par l'eau	- Fermentation rapide	Non	- Goûter pour tester l'acidité et sentir pour apprécier l'odeur caractéristique de la fin de la fermentation		
9. Filtration			Non			
	- Croissance et formation de toxines par <i>Staphylococcus aureus</i>		Non	- Pas de moisissures visibles		

10. Décantation (fermentation de la pâte)		- Enlever la couche supérieure de moisissures	Non	- Goûter pour tester l'acidité		
	- Croissance des moisissures toxiques	- Fermentation rapide	Non		- Observation	- Ne pas utiliser ce produit
	- Croissance des germes acido- résistants	- Laver le matériel à l'eau et au savon avant usage	Oui			
	- Contamination par le matériel	- Se laver les mains à l'eau et au savon avant de commencer			- Observation	- Enlever plus de couches supérieures
	- Contamination par les mains	- Filtrer à travers un tamis propre				
	- Contamination	- Se laver les mains à l'eau et au savon	Oui		- Observation	- Ne pas utiliser ce produit

11. Retrait du surnageant	<ul style="list-style-type: none"> par les insectes, la poussière, corps étrangers - Contamination par les mains - Contamination par le matériel 	<ul style="list-style-type: none"> - si possible se couper les ongles - Réaliser l'opération juste avant cuisson - Laver le matériel au savon avant utilisation avec de l'eau propre, si possible le faire avec une louche propre - Couvrir le récipient - Filtrer à travers un tamis propre - Enlever la couche supérieure 	<p>Oui</p> <p>Non</p> <p>Non</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de moisissures visibles 		
12. Homogénéisation de la pâte fermentée	<ul style="list-style-type: none"> - Contamination par les insectes, la saleté, les corps étrangers - Croissance de moisissures 		<p>Non</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de moisissures visibles 		

13. *Utilisation pâte fermentée de lot différent (« vieille pâte fermentée »)	toxiques	- Se laver les mains si possible se couper les ongles - Laver les ustensiles	Non			
	- Mycotoxines (cf. Matières premières – mil)					
	- Contamination par les mains		Non			
	- Contamination par les ustensiles					
	- Contamination par l'eau (cf. matières premières-eau)					
	- Contamination par le surnageant (cf. retrait surnageant)	- Longue ébullition	Non		- Observation	- Enlever plus de couches supérieures, sinon ne pas utiliser la pâte fermentée
- Résistance de certains germes pathogènes et des spores	- Filtrer à travers un tamis propre		Oui			
- Corps étrangers	- Longue ébullition			- Bulles		

<p>14. *Préparation des grumeaux (benkida)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Résistance certains pathogènes - Résistance certains pathogènes - Résistance de pathogènes - Corps étrangers - Recontamination par les mains, les ustensiles et l'environnement 	<ul style="list-style-type: none"> - Continuer l'ébullition - Continuer l'ébullition - Filtrer à travers un tamis propre - Laver les mains et utiliser du matériel propre - Couvrir le récipient contenant la bouillie et celui contenant le nécessaire de vente 	<p>Non</p> <p>Non</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Pas de corps étrangers - Bulles - Bonne gélatinisation - Bonne cuisson - Bonne gélatinisation - Pas de corps étrangers - Laver avec du savon et rincer avec de l'eau propre - Pas de corps étrangers visibles 	<ul style="list-style-type: none"> - Observation 	<ul style="list-style-type: none"> - Continuer l'ébullition
<p>15. Cuisson A/ Ebullition surnageant (**et/ou du jus de tamarin)</p>		<ul style="list-style-type: none"> - Consommer rapidement 		<ul style="list-style-type: none"> - Observation - Observation 	<ul style="list-style-type: none"> - Observation 	<ul style="list-style-type: none"> - Refaire la filtration

B/*addition grumeaux (bensaalga)	- Croissance de certains germes pathogènes et des spores (<i>Bacillus cereus</i> , <i>Clostridium perfringens</i>)		Oui	- Consommer avant 3H	- Observation	- Continuer l'ébullition
C/ addition pâte fermentée	Cf. Matières premières- sucre		Oui		- Observation	- Continuer l'ébullition
D/ *addition « vielle bouillie »			Oui		- Observation	- Continuer l'ébullition
16. Service			Oui		- Observation	- Refaire la filtration
			Oui		- Observation	- Laver à nouveau
			Oui			- Eliminer les corps étrangers et recouvrir
			Oui			

17. sucrage			Oui		- Suivre le temps	- Servir par vague successive - Laisser à feu doux
-------------	--	--	-----	--	-------------------	---

* Etapes additionnelles

** Rencontré chez les fabricantes faisant deux productions par jour

Bouillies infantiles à base de mil fermenté à Ouagadougou : Vers une analyse des risques microbiologiques dans les micro-entreprises traditionnelles de production

Résumé

L'objectif principal de ce travail vise à améliorer la qualité sanitaire des bouillies infantiles à base de céréales fermentées de mil, consommées en Afrique comme aliments de complément à l'allaitement maternel. Ces bouillies doivent être exemptes de germes susceptibles de provoquer des toxi-infections alimentaires.

L'évaluation de la qualité bactériologique des produits issus de 10 sites de la commune de Ouagadougou au Burkina Faso, nous a permis d'isoler et d'identifier 449 souches des échantillons prélevés à différentes étapes de la fabrication de la bouillie que sont : avant la fermentation de la pâte, à la fin de la fermentation, après la cuisson de la pâte fermentée et lors de la confection des granules. Des dénombrements microbiens réalisés sur les milieux Mac Conkey, Baird Parker, Mannitol-Yolk-Polymyxin et Tryptone Sulfite Cyclosérine de tous les échantillons montrent la présence en grand nombre de différents germes, signe pour certains sites d'une mauvaise hygiène des produits et des procédés. Pour les entérobactéries, l'espèce la plus rencontrée est *Klebsiella pneumo. ssp pneumonia*. Pour les autres bacilles Gram négatif, c'est l'espèce *Chryseomonas luteola*. Pour les staphylocoques, c'est l'espèce *Staphylococcus xylosus*. Pour les bacilles gram positif aptes à sporuler ce sont des souches de *Bacillus cereus* et de *Clostridium beijerinckii/butyricum*. D'un point de vue toxi-infections alimentaires, les espèces suivantes ont été isolées et identifiées : *Bacillus cereus* (19 souches), *Enterobacter sakazakii* (03), *Klebsiella pneumo. spp pneumonia* (16), *Escherichia coli* (04) et *Staphylococcus aureus* (02).

Globalement, on observe une diminution importante des niveaux de population après la fermentation mais les bacilles capables de sporuler se maintiennent dans les produits après cette étape importante du procédé. La cuisson entraîne une diminution drastique voir la disparition de la majorité des germes sauf pour les bacilles aptes à la sporulation.

L'analyse des dangers lors de la fabrication des bouillies a montré que la fermentation et la cuisson de la pâte fermentée sont deux points critiques qu'il faut maîtriser.

Des challenge-tests réalisés avec les souches *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter sakazakii* CIP 103183T, *Bacillus cereus* ATCC 9139 de collection ou les souches *Escherichia coli* AMC2-1, *Enterobacter sakazakii* AMC8-3, *Bacillus cereus* BMYP7-3 isolées des ateliers ont permis l'évaluation du risque de leur développement et cela à certaines étapes des procédés de transformation. La fermentation lactique et surtout la cuisson s'avèrent efficaces pour réduire les populations d'entérobactéries testées. Pour les souches de *Bacillus cereus* testées, elle ne constitue pas une barrière efficace contre le maintien de leurs formes sporulées.

Il en ressort que pour ces différents germes utilisés, la maîtrise du processus de fermentation lors de la décantation de la pâte, la maîtrise de la cuisson à travers le couple temps/température, les contaminations croisées liées à la qualité des ustensiles et à la propreté des productrices sont à maîtriser pour l'obtention d'une bouillie « saine ». La recontamination de la bouillie cuite reste un danger.

L'ajout de nisine dans les bouillies, est sans effet sur les entérobactéries testées alors que cet ajout permet de réduire efficacement les populations de *Bacillus cereus*.

Cette molécule thermostable pourrait être ajoutée en fin d'étape de fermentation et avant cuisson pour cumuler les deux effets : destruction thermique par cuisson et inhibition par la nisine.

Mots Clés : Qualité sanitaire, aliments fermentés, céréales, aliments de complément, jeune enfant, challenge-test, HACCP, nisine, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sakazakii*.

Traditional millet-based fermented gruels for young children of Ouagadougou: Microbiological risks analysis in the household preparation.

Abstract

The aims of this work are to improving quality of traditional millet-based fermented gruels for young children consumed in Africa like complementary food. These gruels must be free from germs likely to cause food infections.

The evaluation of the bacteriological quality of the products resulting from 10 production units of Ouagadougou town to Burkina Faso, allowed us to isolate and identify 449 bacteria of the taken samples at different steps of the gruel manufacturing: before the fermentation of the dough, at the end of the fermentation, after cooking of the fermented dough and granules making.

Microbial enumerations carried out on Mac Conkey, Baird Parker, Mannitol-Yolk-Polymyxin and Trypton Sulfite Cycloserin mediums. All the samples show the presence in great number of various germs, because of the bad hygiene of the products and process. For the enterobacteria, the most met is *Klebsiella pneumo. ssp pneumonia*. For the other negative Gram bacilli, it's *Chryseomonas luteola*. For staphylococci, it is *Staphylococcus xylosus*. For bacilli gram positive suited to spores forming we are identified *Bacillus cereus* and *Clostridium beijerinckii/butyricum*.

About food infections, the following species were isolated and identified: *Bacillus cereus* (19 species), *Enterobacter sakazakii* (03), *Klebsiella pneumo. spp pneumonia* (16), *Escherichia coli* (04) and *Staphylococcus aureus* (02).

Globally, we observe a major reduction in the levels of population after fermentation but the bacilli able to sporulate are maintained in the products after this important step of the process. Cooking involves a drastic reduction to see the disappearance of majority of germs except the bacilli able to sporulate.

Challenge-tests carried out with *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterobacter sakazakii* CIP 103183T, *Bacillus cereus* ATCC 9139 of collection or *Escherichia coli* AMC2-1, *Enterobacter sakazakii* AMC8-3 and *Bacillus cereus* BMYP7-3 isolated from the production units, the evaluation of the risk of their development and that with different steps of the process.

Lactic fermentation and especially cooking prove to be effective to reduce the populations of enterobacteria tested. For *Bacillus cereus*, it does not constitute an effective barrier against the maintenance of the spores.

This reveals that for these various germs used, control of the process of fermentation during the decantation of the dough, control of cooking through time/temperature, the cross contaminations related on the quality of the utensils and the cleanliness of producing are to be controlled for obtaining a "healthy" gruel. The cross-contamination of the cooked gruel remains a danger.

The addition of nisin in the gruel is without effect on the enterobacteria tested whereas this addition makes it possible to reduce effectively the populations of *Bacillus cereus*. This heat-resistant molecule could be added at the end of the fermentation step and before cooking to cumulate the two effects: Thermal destruction by cooking and inhibition by nisin.

Key words: Quality, fermented food, cereals, complementary food, young child, challenge-test, HACCP, nisin, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter sakazakii*.